

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ  
ΜΥΚΗΤΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ *PSEUDOMONAS ENTOMOPHILA***



ΚΟΡΕΚΤΣΙΔΟΥ ΜΑΡΙΑ-ΡΑΧΗΛ

ΛΑΡΙΣΑ 2014

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ  
ΜΥΚΗΤΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ *PSEUDOMONAS ENTOMOPHILA*  
INVESTIGATION OF SUSPENSION OF PHYTOPATHOGENIC  
FUNGI FROM *PSEUDOMONAS ENTOMOPHILA*

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Μόσιαλος Δημήτρης – Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων,  
Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
2. Παπαδοπούλου Καλλιόπη – Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας  
Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. Καρπούζας Δημήτρης – Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας  
Αποικοδομητικών Μικροοργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στον Επίκουρο Καθηγητή Βιοτεχνολογία Μικροβίων του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Μόσιαλο Δημήτριο για την πολύτιμη παροχή επιστημονικής γνώσης καθώς για την ανεκτίμητη και πολύπλευρη συμβολή του στην εκπόνηση αυτής της εργασίας. Τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου απευθύνω στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παπαδοπούλου Καλλιόπη για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες ερευνητικές συμβουλές της, καθώς και ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Επίκουρο Καθηγητή Καρπούζα Δημήτριο για τη σημαντική βοήθεια που μου πρόσφερε. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους υποψήφιους Διδάκτορες Νικολούλη Κατερίνα και Καρα Παναγιώτη για την άψογη συνεργασία, την αμέριστη βοήθεια που μου προσέφεραν για την ολοκλήρωση του πειράματος καθώς και την στήριξη τους στη δημιουργία της εργασίας.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η *Pseudomonas entomophila* απομονώθηκε πρόσφατα από την *Drosophila melanogaster* στο νησί της Γουαδελούπης κατά τη διάρκεια μιας μελέτης με στόχο την απομόνωση και το χαρακτηρισμό βακτηρίων που είναι σε θέση να προκαλέσουν συστηματική ανοσολογική απόκριση στη *Drosophila*. Η *Pseudomonas entomophila* έχει την ικανότητα να μολύνει και να σκοτώνει προνύμφες αλλά και ενήλικα άτομα της *Drosophila melanogaster* μετά από κατάποση ( Vodovar et al . 2005 ). Έρευνες έχουν δείξει πως η μολυσματικότητα της *Pseudomonas entomophila* είναι πολυπαραγοντική. Υποθετικοί μολυσματικοί παράγοντες μπορούν να θεωρηθούν οι εντομοκτόνες τοξίνες, οι αιμολυσίνες, οι εξωκυττάρια πρωτεάσες, οι λιπάσες, και δευτερογενείς μεταβολίτες όπως, το υδροκυάνιο ( Vodovar et al . 2006 ). Δεν είναι όμως ακόμα γνωστό σε ποιο βαθμό και σε τι ποσοστό συμμετέχει ο κάθε παράγοντας τοξικότητας.

Οι παράγοντες αυτοί μπορεί να είναι ικανοί να ανταγωνιστούν φυτοπαθογόνους μύκητες, που έχει σαν αποτέλεσμα πολλές φορές την προστασία του φυτού έναντι των παθογόνων. Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η αναστολής της ανάπτυξης των μυκήτων *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (FORL), *Fusarium oxysporum* f.sp. *raphani* (FOR) και *Fusarium solani* (FsK) από την *P. Entomophila*. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν βιολογικές δοκιμές προκειμένου να ελεγχθεί η δράση της *P. entomophila* απέναντι στους μύκητες σε τρυβλία με κοινό θρεπτικό υλικό ανάπτυξης και η αναστολής της βιομάζας και κονιδίων των μυκήτων παρουσία υπερκειμένου της *P. entomophila*. Τα αποτελέσματα της έρευνας δεν κατέδειξαν κάποιο κρίσιμο ρόλο των δευτερογενών (secondary metabolite ) μεταβολιτών στην αναστολή της ανάπτυξης των μυκήτων ενώ μόνο η παρουσία κυττάρων *Pseudomonas entomophila* μπορεί να μετριάσει την ανάπτυξη και τη διασπορά των μυκήτων.

## ABSTRACT

*Pseudomonas entomophila* was recently isolated from *Drosophila* flies sampled in the island of Guadelupe during a study aiming to isolate and characterize bacteria able to induce a systemic immune response in *Drosophila*. *P. entomophila* is highly pathogenic to *Drosophila* larvae and adults after oral ingestion making it the only so far *Pseudomonas* species which naturally infects and kills insects (Vodovar *et al.* 2005). Previous studies have demonstrated that *Pseudomonas entomophila* virulence is multifactorial. Putative virulence factors annotated in *P. entomophila* genome include insecticidal toxins, hemolysins, extracellular proteases, lipases and secondary metabolites such as hydrogen cyanide (Vodovar *et al.*, 2006). The extent and rate of the involvement of each virulence factor is not yet known, however.

These agents may be able to compete phytopathogen fungi, which often results in the protection of the plant against pathogens. In this work we investigated the inhibition of *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (FORL), *Fusarium oxysporum* f.sp. *raphani* (FOR) and *Fusarium solani* (FsK) fungi growth by *P. Entomophila*. More specifically, biological essays were performed to test the effect of *P. entomophila* against the fungi in plates with common growth medium and the suspension of both mass and conidia of fungi in the presence of supernatant of *P. entomophila*. The survey results do not indicate a critical role of secondary metabolites in growth inhibition of fungi and only the presence of *Pseudomonas entomophila* cells may attenuate the growth and spread of fungi.

## Πίνακας περιεχομένων

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ <i>PSEUDOMONAS</i> .....	8
1.2 <i>PSEUDOMONAS ENTOMOPHILA</i> .....	9
1.3 ΔΟΜΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ .....	11
1.4 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ .....	13
1.5 ΜΥΚΗΤΕΣ .....	21
1.5.1 Γενικά περί μυκήτων.....	21
1.5.2 <i>Fusarium solani</i> K.....	23
1.5.3 <i>Fusarium oxysporum</i> .....	24
1.6 ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ .....	26
1.7 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....	29
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	30
2.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΣΤΕΛΕΧΗ ΚΑΙ ΜΥΚΗΤΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ .....	30
2.2 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ .....	32
2.3 ΔΟΚΙΜΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΚΑΙ ΜΥΚΗΤΩΝ ΣΤΑ ΔΙΑΦΟΡΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ. ....	33
2.4 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΗΣ <i>P. ENTOMOPHILA</i> .....	34
2.5 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ <i>P. ENTOMOPHILA</i> ΣΤΟΥΣ ΜΥΚΗΤΕΣ FORL, FOR ΚΑΙ FSK. ....	35
2.6 ΧΡΗΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΜΕΣΟΥ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΕΝΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΣΙΔΗΡΟΥ- King's B.....	37
2.6.1 Μέτρηση παραγωγής πυοβερδίνης .....	37
2.6.2 Εκτίμηση της ανταγωνιστικής δράσης της <i>P. entomophila</i> στους μύκητες FORL, FOR και Fsk σε θρεπτικό King's B. ....	37
2.7 ΧΡΗΣΗ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟΥ ΤΗΣ <i>P. ENTOMOPHILA</i> ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΜΟΥ.....	38
2.8 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟΥ ΤΗΣ <i>P. ENTOMOPHILA</i> .....	39
2.9 ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΑ.....	41
2.10 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ <i>P. ENTOMOPHILA</i> ΚΑΙ ΤΗΣ <i>P. AERUGINOSA</i> ΣΤΟΥΣ ΜΥΚΗΤΕΣ FORL, FOR ΚΑΙ FSK.....	42
2.11 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ FSK ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟΥ ΤΗΣ <i>P. AERUGINOSA</i> .....	42
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	44

3.1 ΔΟΚΙΜΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΚΑΙ ΜΥΚΗΤΩΝ ΣΤΑ ΔΙΑΦΟΡΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ. ....	44
3.2 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ .....	45
3.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ <i>P. ENTOMOPHILA</i> ΣΤΟΥΣ ΜΥΚΗΤΕΣ FORL, FOR ΚΑΙ FSK ΣΕ ΘΡΕΠΤΙΚΟ LB .....	46
3.4 ΧΡΗΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΦΤΩΧΟ ΣΕ ΣΙΔΗΡΟ- King's B.....	47
3.4.1 Μέτρηση παραγωγής πυοβερδίνης: .....	47
3.4.2 Εκτίμηση της ανταγωνιστικής δράσης της <i>P. entomophila</i> στους μύκητες FORL, FOR και Fsk σε θρεπτικό King's B. ....	48
3.5 ΧΡΗΣΗ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟΥ ΤΗΣ <i>P. ENTOMOPHILA</i> ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΜΟΥ.....	49
3.6 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟΥ ΤΗΣ <i>P. ENTOMOPHILA</i> .....	50
3.7 ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΑ .....	59
3.8 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ <i>P. ENTOMOPHILA</i> ΚΑΙ ΤΗΣ <i>P. AERUGINOSA</i> ΣΤΟΥΣ ΜΥΚΗΤΕΣ FORL, FOR ΚΑΙ FSK.....	61
3.9 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ FSK ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟΥ ΤΗΣ <i>P. AERUGINOSA</i> .....	63
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	66
5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	70

## 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Εντομοπαθογόνα βακτήρια όπως *Bacillus thuringiensis*, *Photorhabdus luminescens* και *Xenorhabdus nematophilus* έχουν αναπτύξει διάφορες στρατηγικές για να αλληλεπιδρούν με τα έντομα και να τα σκοτώνουν (Waterfield *et al.*, 2004; Vallet-Gely *et al.*, 2008). Μέχρι στιγμής πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί σε μεγάλο βαθμό στην παραγωγή εντομοκτόνων τοξίνων από βακτήρια και γενικά στην εύρεση παραγόντων στους οποίους οφείλεται η παθογένεια, λόγω της δυνατότητας χρήσης τους στην ιατρική ή την προστασία έναντι μικροβιακών παθογόνων (Waterfield *et al.*, 2004; Bode 2009; Crickmore 2006). Δυστυχώς, λίγα είναι γνωστά σχετικά με τη φυσιολογία της μολυσματικής διαδικασίας κατά των εντόμων κατά τη διάρκεια αποικισμού από βακτήρια. Αν όμως κάτι τέτοιο διευκρινιστεί μπορεί να είναι δυνατή η παροχή νέων γνώσεων σχετικά με ανθρώπινες λοιμώξεις που προκαλούνται από είδη *Bacillus* ή *Pseudomonas* (Fedhila *et al.* 2009).

### 1.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *PSEUDOMONAS*

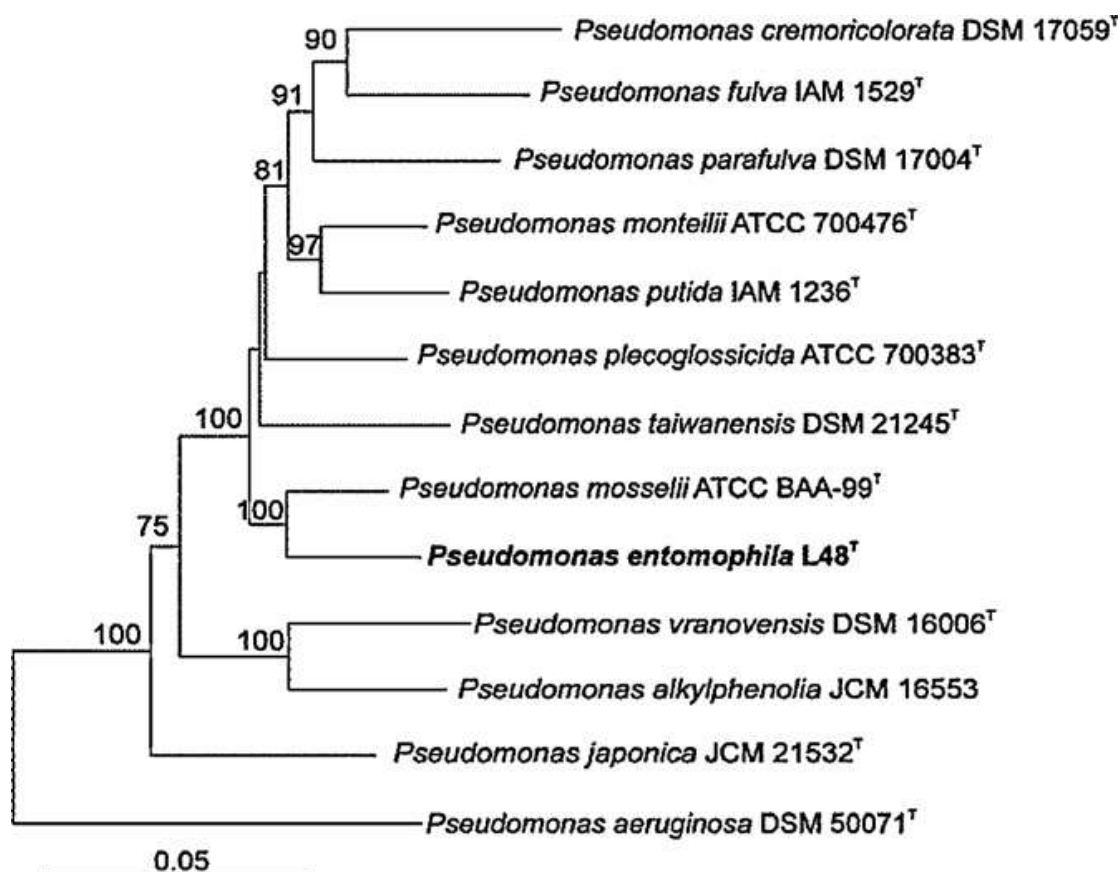
Βακτήρια του γένους *Pseudomonas* αποτελούν την μεγαλύτερη ομάδα Gram (-) αερόβιων βακτηρίων με ικανότητα παραγωγής πλήθους δευτερογενών μεταβολιτών (Palleroni 1984). Από μορφολογικής άποψης είναι ευθύγραμμοι ή ελαφρά κεκαμμένοι βάκιλλοι με πολικά μαστίγια. Έχουν πολύ απλές διατροφικές ανάγκες και αναπτύσσονται χημειοργανοτροφικά σε ουδέτερο pH και σε μεσόφιλο εύρος θερμοκρασιών. Μια πολύ ενδιαφέρουσα ιδιότητα πολλών ψευδομονάδων είναι η χρήση μεγάλης ποικιλίας οργανικών ενώσεων ως πηγών άνθρακα και ενέργειας. Είναι από πλευράς οικολογίας σημαντικοί οργανισμοί στο έδαφος και στο νερό, πιθανότατα υπεύθυνοι για την αποικοδόμηση πολλών ενώσεων που προέρχονται από τη διάσπαση φυτικής και ζωικής ύλης σε οξυγονούχα ενδαιτήματα. Πολλές ψευδομονάδες, καθώς και άλλα Gram (-) βακτήρια μεταβολίζουν τη γλυκόζη μέσω της οδού Entner-Doudoroff. Κύρια χαρακτηριστικά ταυτοποίησής τους είναι η απουσία παραγωγής αερίου από γλυκόζη, καθώς και η θετική δοκιμή οξειδάσης, τα



αποτελέσματα των οποίων βοηθούν στη διάκριση των ψευδομονάδων από τα εντερικά βακτήρια.

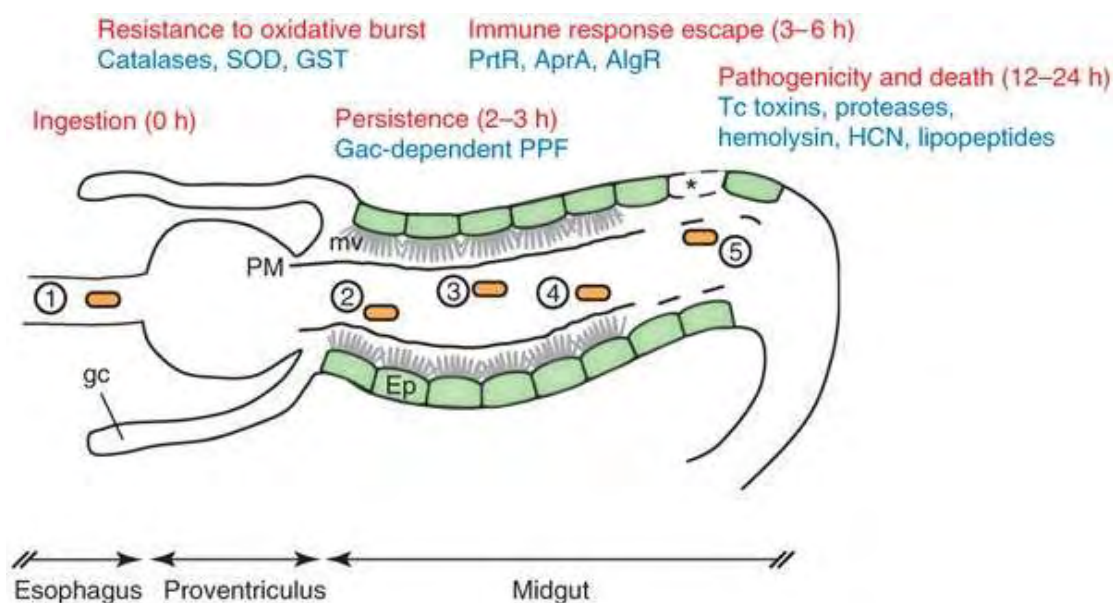
## 1.2 PSEUDOMONAS ENTOMOPHILA

Το βακτήριο *Pseudomonas entomophila* (Pe) απομονώθηκε το 2001 στη Γουαδελούπη από ένα θηλυκό άτομο *Drosophila melanogaster*. Σύγκριση του 16S ριβοσωμικού RNA (rRNA) με τις υπάρχουσες 16S rRNA αλληλουχίες στις βάσεις δεδομένων έδειξε ότι ανήκει στο γένος *Pseudomonas*, και ονομάστηκε *Pseudomonas entomophila* (Vodovar et al. 2005). Πλήρης ταξινομική ταυτοποίηση αποκάλυψε ότι η *P. entomophila* είναι πράγματι ένα νέο είδος που συνδέεται στενά με τα σαπροφυτικά βακτήρια του εδάφους *Pseudomonas putida* και *Pseudomonas mosselli* (Mulet et al. 2012). Παρόλα αυτά διαφέρει από διάφορα είδη *Pseudomonas* στο γεγονός ότι είναι εξαιρετικά παθογόνο για τη *Drosophila melanogaster* ύστερα από κατάποση και προκαλεί το θάνατο τόσο στα ενήλικα άτομα, όσο και στις προνύμφες (Vodovar et al., 2005).



ΕΙΚΟΝΑ 1: Φυλογενετικό δέντρο που δείχνει τη συγγενική σχέση της *P. entomophila* με την *P. Putida* (Vodovar et al., 2005)

Μύγες που έχουν μολυνθεί δια του στόματος με την *P. entomophila* εμφανίζουν τοπικές και συστημικές ανοσολογικές αποκρίσεις. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η δυνατότητα αυτή του βακτηρίου στηρίζεται στην ικανότητα του να προκαλεί μη αναστρέψιμες βλάβες στον εντερικό επιθήλιο, σε αντίθεση με ό, τι παρατηρείται σε άλλα παθογόνα βακτήρια όπως *Erwinia carotovora* ή *Pseudomonas aeruginosa* (Vallet-Gely et al., 2008). Εκτός από τη *Drosophila*, η *P. entomophila* μπορεί να σκοτώσει αποτελεσματικά και άλλα έντομα όπως η *Galleria mellonella*, γεγονός που την καθιστά ένα νέο εντομοπαθογόνο βακτήριο (Fedhila et al 2009). Το βακτήριο ή οι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από αυτό θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως εναλλακτική λύση για την δημιουργία εντομοκτόνων με στόχο την καταπολέμηση εντόμων που είτε καταστρέφουν τις γεωργικές καλλιέργειες, είτε αποτελούν φορείς ασθενειών για ζωικούς οργανισμούς και τον άνθρωπο. Η ικανότητα λοιπόν της *P. entomophila* να μολύνει δια του στόματος και να σκοτώνει τη *Drosophila melanogaster*, καθώς και τις προνύμφες από αρκετά είδη εντόμων (Vodovar et al., 2005), την καθιστά ένα πολλά υποσχόμενο μοντέλο για την αποκρυπτογράφηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ της βακτηριακής παθογένειας και του ανοσοποιητικού συστήματος των εντόμων, καθώς και για την ανάπτυξη τεχνικών βιοελέγχου των επιβλαβών εντόμων.



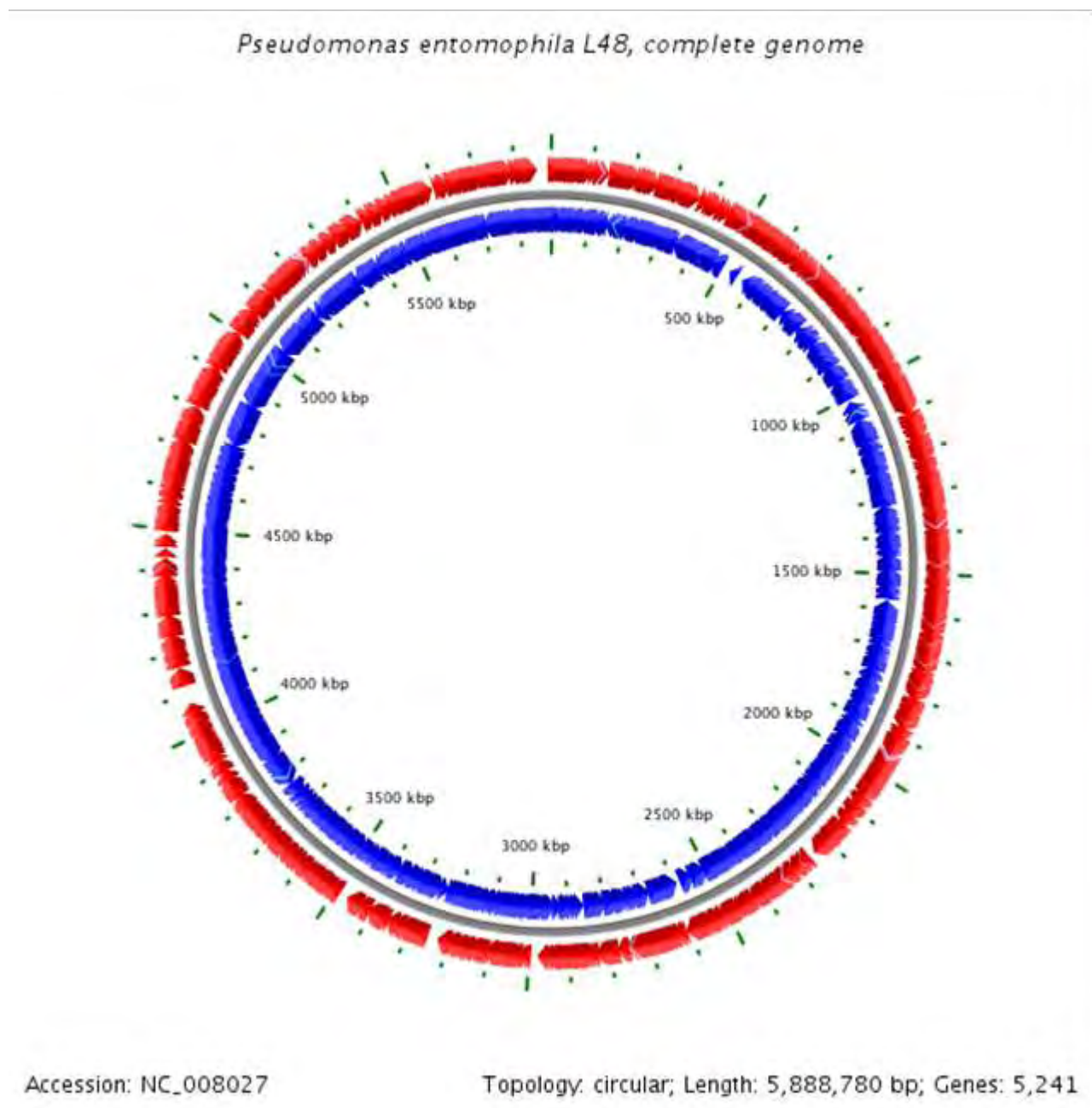
ΕΙΚΟΝΑ 2: Αλληλεπίδραση μεταξύ της *P. entomophila* και της *D. melanogaster* . Πέντε διαφορετικά στάδια που εμφανίζονται : 1 . κατάποση της *P. entomophila* μέσω του οισοφάγου, 2. αντίσταση στο οξειδωτικό στρες ως απάντηση σε μια οξειδωτική έκρηξη στο έντερο, 3. επιμονή της *P. entomophila* στο έντερο, 4. η *P. entomophila* ξεφεύγει από το ανοσοποιητικό σύστημα, 5 . παθογένεια και θανατηφόρος έκβαση της αλληλεπίδρασης μετά από σημαντικές τροποποιήσεις της φυσιολογίας του μέσου εντέρου

### 1.3 ΔΟΜΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ

Η πλήρης αλληλουχία του γονιδιώματος της *P. entomophila* προσέφερε μια εικόνα σχετικά με τον τρόπο ζωής του εντομοπαθογόνου αυτού οργανισμού. Ολοκληρώθηκε το 2006 (Vodovar et al., 2006) και αποκαλύφθηκε πως αποτελείται από ένα κυκλικό χρωμόσωμα 5.888.780 νουκλεοτιδίων. Ανάμεσα στις 5.169 αλληλουχίες που ταυτοποιήθηκαν, έχουν αποδοθεί συγκεκριμένες λειτουργίες σε ένα ποσοστό 67%, δηλαδή σε περίπου 3.466 γονίδια. Η σύγκριση των γονιδιωμάτων των 5 αντιπροσωπευτικών ειδών *Pseudomonas* (*P. aeruginosa* *P. syringae* *P. fluorescens* *P. putida* *P. entomophila*) με το πρόγραμμα BLAST αποκάλυψε πως το γονιδίωμα της *P. entomophila* είναι μικρότερο από τα γονιδιώματα των υπολοίπων ειδών (Vodovar et al., 2006). Το πυρηνικό γονιδίωμα του γένους αποτελείται από 2.065 γονίδια. Με βάση αυτή την ανάλυση ταυτοποιήθηκαν 1.002 γονίδια μοναδικά στο γονιδίωμα της *P. entomophila* (Vodovar et al., 2006).

Επιπλέον, η σύγκριση των γονιδιωμάτων κατέδειξε πως η *P. entomophila* διαθέτει περισσότερα καταβολικά γονίδια από το στενά συνδεδεμένο στέλεχος *P. putida*, αποκαλύπτοντας τις μεταβολικές της ιδιότητες και τον τρόπο ζωής της (Vodovar et al., 2006). Επιπρόσθετα διαθέτει τουλάχιστον 3.630 γονίδια που είναι ορθόλογα με την *P. putida* (Vodovar et al., 2006), γεγονός που επιβεβαιώνει τη στενή συγγενική τους σχέση. Απροσδόκητα για ένα ζωικό παθογόνο, η *P. entomophila* δε διαθέτει ένα εκκριτικό σύστημα τύπου III (Vodovar et al., 2006) αλλά μάλλον βασίζεται σε ένα μεγάλο αριθμό παθογόνων παραγόντων, όπως εντομοκτόνες τοξίνες, πρωτεάσες, αιμολυσίνες, υδροκυάνιο και δευτερογενείς μεταβολίτες που μολύνουν και σκοτώνουν έντομα. Ακόμη, αποκαλύφθηκε ο ρόλος του συστήματος δύο

συστατικών GacS/GacA που ρυθμίζει πολλούς από τους λοιμογόνους παράγοντες. Η πλήρης αλληλουχία του γονιδιώματος της *P. entomophila* αποκάλυψε αρκετούς πιθανούς παράγοντες μολυσματικότητας μαζί με ρυθμιστές που ρυθμίζουν την έκφραση τους.



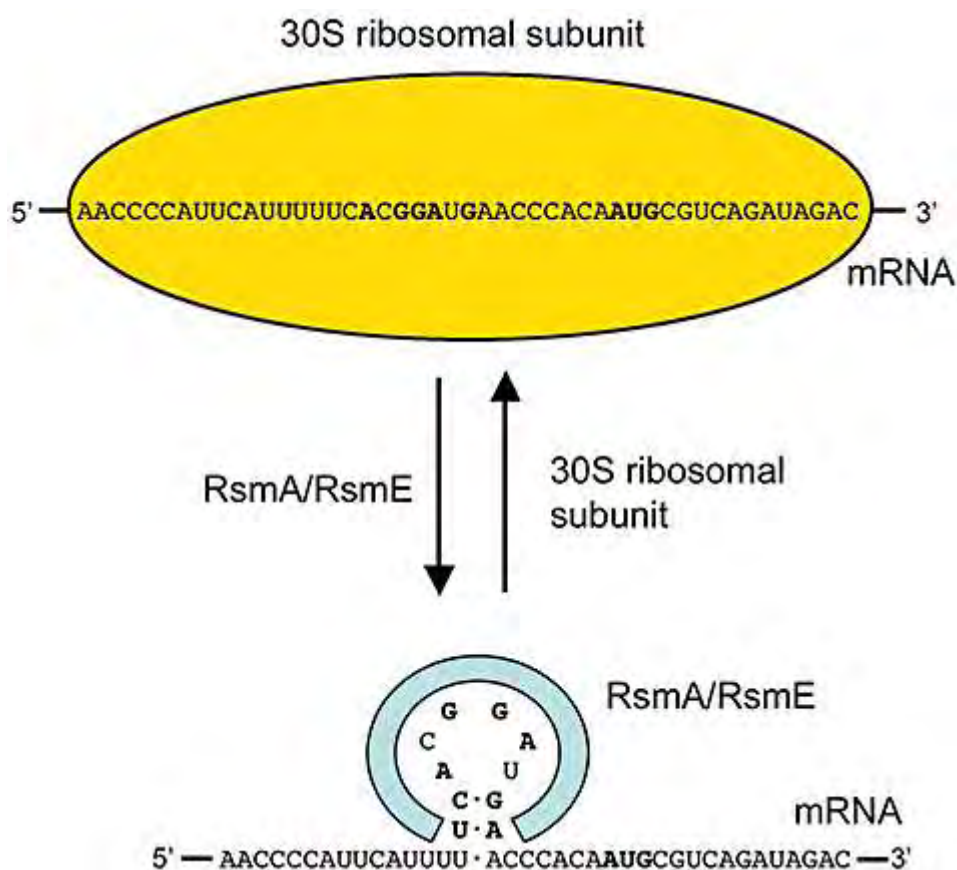
ΕΙΚΟΝΑ 3: Το πλήρες γονιδίωμα της *P. entomophila*

## 1.4 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Είναι αρκετά πιθανό η παθογένεια της *P. entomophila* να είναι πολυπαραγοντική και να συμμετέχουν διαφορετικοί μολυσματικοί παράγοντες για τη λοίμωξη και την παθογένεια. Εισαγωγική μεταλλαξιγένεση επέτρεψε την πειραματική ταυτοποίηση των γονιδίων της *P. entomophila* που εμπλέκονται άμεσα ή έμμεσα στην μόλυνση. Η ανάλυση αποκάλυψε το σημαντικό ρόλο του GacS/GacA, ένα ρυθμιστικό σύστημα δύο συστατικών το οποίο φαίνεται να προωθεί τη μόλυνση και θνησιμότητα. Το GacS είναι μια κινάση που ανιχνεύει τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα και το GacA είναι ο ρυθμιστής της απάντησης στο ερέθισμα ( Vodovar et al 2005 , Vodovar et al 2006 ). Στην *P. entomophila* η έκκριση των σηματοδοτικών μορίων που ενεργοποιούν το GacS/GacA σύστημα παρατηρείται όταν ο βακτηριακός πληθυσμός βρίσκεται σε μεγάλη πυκνότητα και στο χρονικό σημείο κατά το οποίο γίνεται η μετάβαση από την εκθετική φάση ανάπτυξης στην φάση στασιμότητας (Blumer et al. 1999). Το σύστημα αυτό παίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της *P. entomophila*, καθώς ρυθμίζει τη μεταγραφή μικρών μορίων RNA ( sRNAs ). Η κύρια λειτουργία αυτών των sRNAs είναι να καταστείλει mRNAs που κωδικοποιούν λοιμογόνους παράγοντες, δευτερογενείς μεταβολίτες (Vodovar et al., 2006). Ο σημαντικός του ρόλος αποδεικνύεται από το γεγονός πως μεταλλαγμένα στελέχη *gacS/gacA* της *P. entomophila* εμφανίζουν μειωμένη ή καθόλου παθογένεια στη *Drosophila* (Vallet-Gely 2009).

Λεπτομερείς αναλύσεις έχουν δείξει πως το GacA δεν αλληλεπιδρά απευθείας με τον υποκινητή των γονιδίων (Blumer and Haas 2000; Blumer et al. 1999). Πιο συγκεκριμένα, το σύστημα δύο συστατικών GacS/GacA ελέγχει θετικά την έκφραση ενός έως πέντε μικρών RNAs (sRNAs) που χαρακτηρίζονται από επαναλαμβανόμενα GGA μοτίβα. Τα μοτίβα GGA είναι απαραίτητα για την πρόσδεση μικρών, διμερών RNA - πρωτεϊνών δέσμευσης της οικογένειας RSMA ( CSRA ) . Αυτές οι πρωτεΐνες, οι οποίες εμφανίζονται επίσης σε πολλά βακτηριακά είδη εκτός από τα γ-πρωτεοβακτήρια, δρουν ως καταστολείς της μετάφρασης ορισμένων mRNAs όταν αυτά περιέχουν μια θέση πρόσδεσης RSMA / CSRA κοντά στην αλληλουχία Shine-Dalgarno και κάποιες επιπλέον θέσεις σύνδεσης που βρίσκονται στην 5'

αμετάφραστη περιοχή. Πρόσφατα δεδομένα απέδειξαν ότι η RSMA - όπως η πρωτεΐνη RsmE της *Pseudomonas fluorescens* συνδέεται με την αλληλουχία RNA 5' -A / UCANGGANGU/A-3 » ( όπου N είναι οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο ). Μια τέτοια αλληλεπίδραση με μία πρωτεΐνη RSMA / CSRA προάγει τον σχηματισμό ενός μικρού βρόχου. Αυτή η διαμόρφωση εμποδίζει την πρόσβαση στη 30S ριβοσωμική υπομονάδα και ως εκ τούτου την έναρξη της μετάφρασης γονιδίων, όπως τα *hcnABC* (Lapouge et al., 2007). Τα μικρά ρυθμιστικά RNAs (RsmX,Y,Z), που επάγονται από το σύστημα GacS/GacA, δεσμεύονται στις πρωτεΐνες RsmA και RsmE με αποτέλεσμα να επιτρέπεται η μετάφραση του mRNA γονιδίων δευτερογενών μεταβολιτών.



ΕΙΚΟΝΑ 10: Σηματοδοτικό μονοπάτι του ρυθμιστικού συστήματος GacS/GacA στην *P. entomophila* (Lapouge et al., 2007)

Πρόσφατα εντοπίστηκε ένα δεύτερο ρυθμιστικό σύστημα που εμπλέκεται στην παθογένεια της *P. entomophila*. Αν και η λειτουργία του δεν είναι καλά

αναγνωρισμένη φαίνεται πως σχετίζεται με την παραγωγή ενός δευτερογενούς μεταβολίτη που λειτουργεί ως μόριο σήματος και ενεργοποιεί με τη σειρά του ρυθμιστές της απόκρισης. Συντίθεται από ένα σύμπλεγμα γονιδίου που ονομάζονται *pnf*. Για να χαρακτηριστεί καλύτερα ο ρόλος των γονιδίων *pnf* στη μολυσματική διεργασία, πραγματοποιήθηκε σύγκριση της ικανότητας παραμονής στο έντερο ενός μεταλλαγμένου *pnf* σε σχέση με του αγρίου-τύπου στελέχης. Διαπιστώθηκε ότι σε ένα *pnf* μεταλλαγμένο στέλεχος επηρεάζεται η ικανότητά παραμονής στο έντερο της *Drosophila*. Επιπρόσθετα, ένα *pnf* μετάλλαγμα δεν είναι ικανό να ενεργοποιήσει στη μύγα ανοσολογική απόκριση, τόσο σε τοπικό όσο και σε συστημικό επίπεδο. Επίσης, ελέγχθηκε εάν τα *pnf* γονίδια εισαχθούν σε ένα άλλο στέλεχος *Pseudomonas* και προκαλούσαν παθογένεια τότε θα μπορούσε να ειπωθεί πως τα *pnf* γονίδια αποτελούν βασικό παράγοντα παθογένειας για την *P. Entomophila*, ικανό να σκοτώσει τη *Drosophila*. Διαπιστώθηκε όμως πως τα γονίδια *pnf* δεν μπορούσαν να παρέχουν από μόνα τους την ικανότητα να επιμένουν και να προκαλούν μη αναστρέψιμη βλάβη στο έντερο *Drosophila*. Συλλογικά διαπιστώθηκε ότι η παθογένεια της *P. entomophila* ρυθμίζεται από δύο ανεξάρτητα ρυθμιστικά κυκλώματα τα GacS/GacA και *pnf* σύστημα ( Vallet - Gely et al . 2010a ).

Η *Pseudomonas entomophila* παραμένει στο έντερο της *Drosophila* μετά από κατάποση, η οποία διεγείρει την παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων, τόσο σε τοπικό επίπεδο στο εντερικό επιθήλιο όσο και σε συστημικό στην αιμολέμφο (Vodovar et al, 2006, Vodovar et al, 2006). Η *P. entomophila* εξουδετερώνει την τοπική ανοσολογική απάντηση της *Drosophila* μέσω έκκρισης μιας πρωτεΐσης, Apra, η οποία αποικοδομεί αντιμικροβιακά πεπτίδια που παράγονται στο εντερικό επιθήλιο, προωθώντας έτσι την παραμονή του βακτηρίου στο έντερο ( Liehl et al . 2006). Μια μετάλλαξη που οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή της πρωτεΐσης AprA έδειξε και μειωμένη εντομοπαθογένεια. Η πρωτεΐση AprA ρυθμίζεται από το σύστημα GacS/GacA ( Liehl et al 2006 ; Opota et al 2011).

Στο γονιδίωμα της *Pseudomonas entomophila* υπάρχουν τρία γονίδια που απουσιάζουν από γονιδιώματα άλλων ειδών *Pseudomonas*. Πρόκειται για γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που σχετίζονται με εντομοκτόνες τοξίνες που έχουν βρεθεί σε εντομοπαθογόνα εντεροβακτήρια όπως *Photorhabdus luminescens*, *Serratia entomophila*, *Xenorhabdus nematophilus*. Αυτές οι (TccC-type) τοξίνες ( PSEEN2485, PSEEN2697, PSEEN2788) ενδεχομένως παίζουν σημαντικό ρόλο στην

παθογένεια της *P. entomophila* (Vodovar N. et al., 2006). Οι βακτηριακές αιμολυσίνες είναι εξωτοξίνες, που έχουν σαν στόχο τις μεμβράνες των κυττάρων του αίματος και προκαλούν ρήξεις στα κύτταρα, με ένα μηχανισμό που δεν είναι ακόμα απόλυτα κατανοητός. Η *P. entomophila* παρουσιάζει έντονη αιμολυτική δραστηριότητα, που πιθανότατα εμπλέκεται στην παθογένεια της *Drosophila*. Συγκεκριμένα έχει βρεθεί πως η RTX πρωτεΐνη (PSEEN3925), καθώς και ένας αριθμός λιπασών συμβάλλουν στην αιμολυτική δραστηριότητα της *P. entomophila* (Vodovar N. et al., 2006). Οι πρωτεάσες αποτελούν μια άλλη σημαντική ομάδα εκκρινόμενων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην μολυσματικότητα των βακτηρίων. Η *P. entomophila* κωδικοποιεί για 3 πρωτεάσες σερίνης, καθώς και για μια αλκαλική πρωτεάση (PSEEN1550). Το PSEEN1550 είναι το ομόλογο της αλκαλικής πρωτεάσης AprA, η οποία έχει αποδειχθεί πως εμπλέκεται σε διάφορες διεργασίες μολυσματικότητας.

Η *P. entomophila* φέρει έναν αριθμό γονιδίων που μπορεί να μην απαιτούνται μόνο για την αλληλεπίδραση με τα έντομα, αλλά σχετίζονται με τον τρόπο ζωής του βακτηρίου στο έδαφος, στο υδάτινο περιβάλλον ή στη ριζόσφαιρα. Οι φθορίζουσες ψευδομονάδες χαρακτηρίζονται από την παραγωγή πυοβερδίνης. Πρόκειται για σιδηροφόρο που περιέχει ένα χρωμοφόρο που συνδέεται με ένα μικρό πεπτίδιο ποικίλου μήκους. Στην *P. entomophila*, δύο δέσμες γονιδίων κωδικοποιούν πρωτεΐνες που απαιτούνται για τη βιοσύνθεση πυοβερδίνης (PSEEN1813-PSEEN1815 και (PSEEN3224-3234). Επίσης στο γονιδίωμα της *P. entomophila* ταυτοποιήθηκαν πέντε ομάδες γονιδίων που κατευθύνουν την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών. Τα γονίδια PSEEN5520-PSEEN5522 είναι υπεύθυνα για την παραγωγή υδροκυανίου.



Table 2 Gene/gene products potentially involved in *P. entomophila*-*D. melanogaster* interaction

Gene/gene product <sup>a,b,c</sup>	Function	Ps. <sup>d</sup>
<b>Adhesion</b>		
PSEEN0141 <sup>a</sup>	Putative surface adhesion protein	54% PP0168 <sup>e</sup>
PSEEN2177 <sup>a</sup>	Putative filamentous hemagglutinin	51% PFL4237
PSEEN3946 <sup>a</sup>	Putative filamentous hemagglutinin	41% PA0041
PSEEN3161	Putative autotransporter, pertactin-like protein	63% PP3069
PSEEN4310 <sup>a</sup>	Putative autotransporter, pertactin-like protein	42% PSPT02225
<b>Proteases</b>		
<i>aprA</i> <sup>c</sup>	Alkaline metalloprotease	72% PSPT03332
PSEEN3027 <sup>b</sup>	Putative autotransporter, SSP-h1 serine protease	68% PSPT01650
PSEEN3028 <sup>b</sup>	Putative autotransporter, serine protease	64% PA3535
PSEEN4433 <sup>a</sup>	Putative subtilisin-like serine protease	Absent
<b>Lipases</b>		
PSEEN0709 <sup>b</sup>	Lysophospholipase	76% PA2540
PSEEN1065 <sup>b</sup>	Phospholipase C	62% PFL0888
PSEEN2195	Triacylglycerol lipase	64% Pf B52 (P21773)*
PSEEN3432 <sup>a,b</sup>	Lipase class3	48% Pfo0149
<b>Toxins</b>		
<i>hcnABC</i> <sup>c</sup>	Hydrogen cyanide production	76% PA2193 ( <i>hcnA</i> )
PSEEN0132/3332/3042-5 <sup>a,b</sup>	Cluster involved in lipopeptide I biosynthesis	See text <sup>h</sup>
PSEEN2138-56 <sup>a,b</sup>	Cluster involved in lipopeptide II biosynthesis	Absent
PSEEN2716-20 <sup>b</sup>	Cluster involved in lipopeptide III biosynthesis	77% Pfo2266 (2717)
PSEEN5524-36 <sup>a,b</sup>	Cluster involved in polyketide biosynthesis	Absent
PSEEN0701 <sup>a,b</sup>	Protein related to TccC-type insecticidal toxin	Absent <sup>f</sup>
PSEEN0702 <sup>a,b</sup>	Protein related to TccC-type insecticidal toxin	Absent <sup>f</sup>
PSEEN1172 <sup>a</sup>	Protein related to TcdB-type insecticidal toxin	Absent <sup>f</sup>
PSEEN2485 <sup>a,c</sup>	TccC-type insecticidal toxin	Absent
PSEEN2697 <sup>a,b,c</sup>	TccC-type insecticidal toxin	Absent
PSEEN2788 <sup>a,b,c</sup>	TccC-type insecticidal toxin	Absent
PSEEN3326 <sup>a,b</sup>	Putative toxin (cytotoxic distending toxin B domains)	Absent
PSEEN3925-9 <sup>a</sup>	Putative RTX toxin and type I secretion system	Absent

### Παραγωγή υδροκυανίου

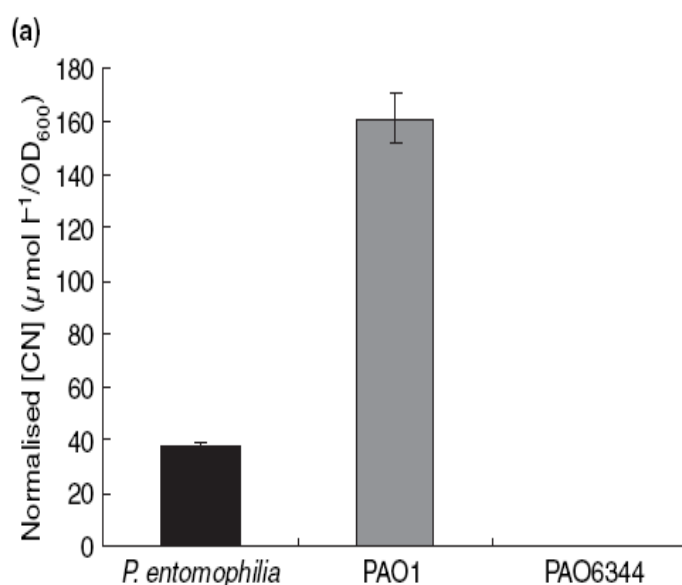
Η βιοσύνθεση του δευτερογενούς μεταβολίτη κυανιούχου υδρογόνου ( HCN ) έχει καταδειχθεί σε ένα μικρό αριθμό των βακτηριακών ειδών, όπως *Pseudomonas aeruginosa* , *Pseudomonas fluorescens* και *Chromobacterium violaceum* ( Askeland & Morrison, 1983 ; Castric 1979 ; Knowles & Bunch, 1986 ). Στα στελέχη αυτά το HCN δεν φαίνεται να έχει ρόλο στον πρωτογενή μεταβολισμό, αλλά αποτελεί ένα ισχυρό αναστολέα της οξειδάσης του κυτοχρώματος c.. Η παραγωγή HCN είναι μέγιστη κατά τη διάρκεια της μετάβασης από την εκθετική στη στατική φάση (

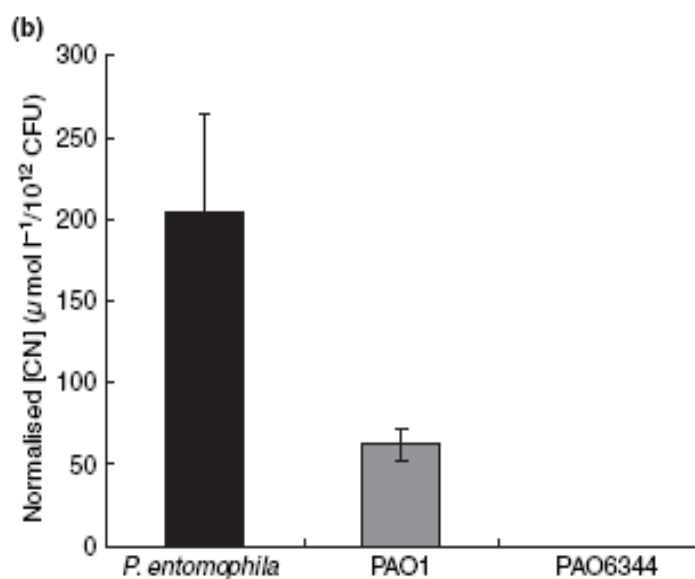
Castric et al 1979 ; Askeland & Morrison 1983) και επηρεάζεται από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως σίδηρο, φώσφορο καθώς και τη συγκέντρωση οξυγόνου ( Knowles & Bunch, 1986). Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση παραγωγής του HCN είναι η συνθάση του HCN. Πρόκειται για ένα μεμβρανικό φλαβοένζυμο, το οποίο χρησιμοποιεί σαν υπόστρωμα την γλυκίνη και μέσω της οξειδωτικής αποκαρβοξυλίωσης την μετατρέπει σε HCN και CO<sub>2</sub> (Castric et al., 1977). Η συνθάση του HCN είναι πολύ ασταθής και ευαίσθητη στο οξυγόνο και γι' αυτό το λόγο έχει καθαριστεί μόνο μερικώς (Blumer and Haas, 2000).

Η HCN συνθάση της *P. fluorescens* CHA0 κωδικοποιείται από το σύμπλεγμα γονιδίων *hcnABC* ( Laville et al., 1998 ). Η παραγωγή υδροκυανίου ρυθμίζεται από το σύστημα δυο συστατικών GacS/GacA και εξαρτάται και από την ANR πρωτεΐνη. Η ANR πρωτεΐνη αποτελεί ένα μεταγραφικό παράγοντα και ανήκει στην οικογένεια FNR. Ο υποκινητής των *hcnABC* γονιδίων περιέχει μια FNR/ ANR περιοχή στο ανοδικό του τμήμα. Τα ίδια ρυθμιστικά στοιχεία εμπλέκονται επίσης στον σχηματισμό HCN στην *P. aeruginosa* (Reimmann et al , 1997 ; Zimmermann et al , 1991). Η βιολογική λειτουργία της παραγωγής κυανιούχου μεταξύ των βακτηρίων δεν είναι πλήρως κατανοητή, αλλά προσδίδει πιθανώς ένα πλεονέκτημα έναντι των ανταγωνιστών ( Haas και Defago , 2005). Η παραγωγή υδροκυανίου έχει αποδειχθεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της *P. aeruginosa* ενάντια στη *Drosophila*, μετά από πειραματική λοίμωξη, αυξάνοντας την πιθανότητα πως το HCN καθώς και άλλα παράγωγα κυανιδίου αποτελούν σημαντικούς παράγοντες μολυσματικότητας αυτού του βακτηρίου (Gallagher και Manoil 2001; Broderick et al 2008 ).

Η παρουσία της *hcnABC* (PSEEN5522, PSEEN5521, PSEEN5520) ομάδας γονιδίων στο γονιδίωμα της *P. entomophila* οδήγησε τους επιστήμονες στην υπόθεση πως και αυτό το είδος *Pseudomonas* παράγει HCN. Για να εξακριβωθεί η παραπάνω υπόθεση χρησιμοποιήθηκε ως θετικό δείγμα το βακτήριο *P. aeruginosa* PAO1, που είναι γνωστό πως παράγει υδροκυάνιο και ως αρνητικό δείγμα το μετάλλαγμα  $\Delta hcnB$  (PAO6344) της *P. aeruginosa* (Pessi and Haas 2000; Zlosnik and Williams 2004). Όλες οι μετρήσεις HCN κανονικοποιήθηκαν σε βακτηριακή ανάπτυξη (OD600) επιτρέποντας έτσι τις συγκρίσεις μεταξύ των στελεχών. Αποδείχθηκε πως η *P. entomophila* παράγει υδροκυάνιο σε υγρές καλλιέργειες στην αρχή της φάσης στασιμότητας σε συγκέντρωση μέχρι 40  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , δηλαδή σε επίπεδα που είναι 3 ή 4

φορές χαμηλότερα από τα επίπεδα που παράγει ο άγριος τύπος *P. aeruginosa* PAO1. Παραγωγή HCN παρατηρήθηκε επίσης και σε στερεές καλλιέργειες, στις οποίες όμως η *P. entomophila* παρήγαγε HCN σε πολύ υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τις υγρές καλλιέργειες (Ryall et al., 2009). Βέβαια, δεν υπάρχει καμία απόδειξη για το ρόλο του στην παθογένεια δεδομένου ότι στελέχη *P. entomophila* με ανεπάρκεια στο HCN δεν έδειξαν μειωμένη μολυσματικότητα κατά της *Drosophila* ( Νικολούλη και Μόσιαλος αδημοσίευτα αποτελέσματα). Παρ'όλα αυτά, είναι πιθανό ότι η παραγωγή HCN είναι απαραίτητη για την επιβίωση σε συγκεκριμένα ενδιαίτηματα (π.χ. ριζόσφαιρα εδάφους).





ΕΙΚΟΝΑ 9: α) Παραγωγή HCN σε υγρές καλλιέργειες *P. entomophila*

β) Παραγωγή HCN σε στερεές καλλιέργειες *P. entomophila*. Η παραγωγή HCN είναι πολύ μεγαλύτερη στις στερεές καλλιέργειες. (Ryall et al., 2009)

## 1.5 ΜΥΚΗΤΕΣ

### 1.5.1 Γενικά περί μυκήτων

Οι μύκητες αποτελούν μια ομάδα μικροοργανισμών που η ύπαρξη τους στο πλανήτη γη χρονολογείται περίπου 400 εκατομμύρια χρόνια. Αποτελούν ένα είδος με μεγάλη ικανότητα προσαρμογής στο περιβάλλον και μπορούν, επιτελώντας διάφορες λειτουργίες και μηχανισμούς να εξασφαλίσουν τη διαβίωση (συνήθως εις βάρος κάποιου ξενιστή) καθώς και την αναπαραγωγή τους. Οι μύκητες είναι το τρίτο από τα πέντε βασίλεια του Whittaker και περιλαμβάνει 6 φύλλα (Μαργαρίτης Λ.Χ., 2004).

Ζουν σε ποικιλία υποστρωμάτων και είναι μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι. Οι πολυκύτταροι αποτελούνται από νηματοειδείς μίσχους, που ονομάζονται υφές και τα συμπλέγματα των υφών σχηματίζουν μυκήλια, που πρακτικά αντιπροσωπεύουν το «σώμα» ενός μύκητα. Σε μερικούς από αυτούς, οι υφές δεν αποτελούνται από διακριτά μεταξύ τους κύτταρα, αλλά δημιουργούνται με αλληπάλληλες κυτταρικές διαιρέσεις. Τα κυτταρικά τοιχώματα των περισσότερων μυκήτων είναι κατασκευασμένα από χιτίνη ή υδατανθρακικές ενώσεις, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις, τα παχιά τοιχώματα των υφών και των σπόρων είναι προσαρμογές που τους επιτρέπουν να ζουν σε περιόδους ξηρασίας (Μαργαρίτης Λ.Χ., 2004).

Οι μύκητες δεν έχουν χλωροφύλλη και συνεπώς δεν μπορούν να φωτοσυνθέσουν. Έτσι προσλαμβάνουν θρεπτικά είτε από νεκρή οργανική ουσία (σαπροφυτικοί μύκητες) είτε από ζωντανούς οργανισμούς (παρασιτικοί μύκητες), εκκρίνοντας πεπτικά ένζυμα στο περιβάλλον τους και απορροφώντας τα προϊόντα της εξωκυτταρικής πέψης. Το εκτεταμένο δίκτυο νηματίων του μυκηλίου λειτουργεί σαν μια τεράστια επιφάνεια απορρόφησης θρεπτικών. Οι σαπροφυτικοί μύκητες είναι υπεύθυνοι για την αποσύνθεση ξύλου, χαρτιού κ.λπ.. Διασπούν την κυτταρίνη του ξύλου και από τα μόρια γλυκόζης που απελευθερώνονται προσλαμβάνουν τον άνθρακα που τους χρειάζεται. Από την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών προσλαμβάνουν το άζωτο, ενώ το οξυγόνο και το υδρογόνο τα παίρνουν από το νερό και τους υδατάνθρακες. Οι παρασιτικοί μύκητες εισέρχονται στον ξενιστή και απορροφούν τα θρεπτικά συστατικά είτε μέσω των τοιχωμάτων των νηματίων, τα οποία προσκολλούνται στα κύτταρα των εσωτερικών ιστών του ξενιστή, είτε μέσω μυζητήρων, οι οποίοι διεισδύουν στα κύτταρα του ξενιστή.

Οι μύκητες μπορούν να αναπαραχθούν είτε αγενώς είτε εγγενώς. Τα περισσότερα είδη αναπαράγονται και με τους δύο τρόπους. Κυριότερη αναπαραγωγική μονάδα είναι το σπόριο που παράγεται σε ειδικά όργανα και κατά την αγενή αναπαραγωγή (αγενή σπόρια) και την εγγενή (εγγενή σπόρια).

Αγενής αναπαραγωγή. Η αγενής αναπαραγωγή πραγματοποιείται είτε με απλή διαίρεση (μίτωση) ενός κυττάρου σε δύο θυγατρικά, τα οποία μετά από ένα στάδιο αύξησης διαιρούνται με τη σειρά τους, είτε με εκβλαστήματα, τα οποία δημιουργούνται στην επιφάνεια του αρχικού κυττάρου, αναπτύσσονται σε μέγεθος και τελικά αποκόβονται και γίνονται ανεξάρτητα κύτταρα, είτε με παραγωγή σπορίων από ειδικές δομές, τα σποριαγγεία.

Εγγενής αναπαραγωγή. Κατά την εγγενή αναπαραγωγή διακρίνουμε 3 φάσεις:

- Με διάφορους τρόπους δύο γενετικά διαφορετικά νημάτια συγχωνεύουν το περιεχόμενο δύο κυττάρων τους φέρνοντας κοντά τους δύο απλοειδείς τους πυρήνες. Στους πιο εξελιγμένους μύκητες, δυο διαφορετικά νημάτια έρχονται σε επαφή και συγχωνεύουν το κυτταρόπλασμά τους. Άλλοι μύκητες παράγουν γαμέτες σε διαφοροποιημένα σεξουαλικά όργανα, τα γαμετάγγεια. Κατά την αναπαραγωγή τα ίδια τα γαμετάγγεια έρχονται σε επαφή.
- Οι δύο απλοειδείς πυρήνες συγχωνεύονται σε ένα διπλοειδή. Στους κατώτερους μύκητες αυτό συμβαίνει σχεδόν αμέσως, ενώ στους ανώτερους μπορεί να καθυστερήσει για μέρες, μήνες ακόμη κα χρόνια. Στη δεύτερη περίπτωση, δημιουργείται ένα διπύρηνιο κύτταρο που περιέχει έναν πυρήνα από κάθε γονέα (ετεροκαρυωτικό ή δικαρυωτικό κύτταρο).
- Αμέσως μετά την ένωση των πυρήνων ακολουθεί η μείωση που επαναφέρει τους πυρήνες στον απλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων. Τα προϊόντα της μείωσης είναι διαφορετικοί τύποι σπορίων, γνωστοί ως μειοσπόρια. Τα σπόρια δεν έχουν ικανότητα μετακίνησης και διασπείρονται με τον αέρα. Είναι πολύ ελαφρά και μπορούν να παραμείνουν αιωρούμενα για μεγάλα διαστήματα και να ταξιδέψουν σε μεγάλες αποστάσεις. Έτσι εξασφαλίζεται και η διασπορά του

μύκητα. Από τη στιγμή που βρεθούν στο κατάλληλο μέρος εκβλασταίνουν και δίνουν νέο μυκήλιο.

Ανάμεσα στις τόσες απειλές που δέχονται τα φυτά μια από τις σημαντικότερες είναι και αυτή των παθογόνων μυκήτων. Τα αίτια αυτής της μάχης εκατομμυρίων χρόνων ανάμεσα στα δύο στρατόπεδα αποτελεί η ανεύρεση χώρου, θρεπτικών και γενικά η επιβίωση του ενός εις βάρος του άλλου. Περισσότερα από 8000 είδη μυκήτων έχουν προσδιοριστεί ως φυτοπαθογόνα. Σχεδόν όλα τα φυτά προσβάλλονται από μερικά είδη μυκήτων. Ορισμένοι φυτοπαθογόνοι μύκητες μπορούν να προσλάβουν πολλά είδη φυτών, ενώ άλλοι μόνο λίγα. Μερικοί προσβάλλουν μόνο ένα είδος φυτού. Η επιβίωση και η ανάπτυξη των μυκήτων, εξαρτάται σε πολύ μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες περιβάλλοντος, όπως την υγρασία, τη θερμοκρασία, τη διαθεσιμότητα τροφής, παράγοντες που καθορίζουν τη δυνατότητα πρόσληψης των θρεπτικών στοιχείων. Ο ρόλος των μυκήτων εκτός από επιζήμιος, μπορεί να αποδειχθεί και ευεργετικός μέχρι σημείου ενεργοποίησης επαγόμενων αμύνων. Η αναγνώριση των MAMPs (microbe-associated molecular patterns) από το φυτό όσον αφορά τους φυτοπροστατευτικούς μύκητες δεν έχει αποσαφηνιστεί τελείως. Μύκητες του γένους *Trichoderma spp* που παράγουν κυτταρίνη καθώς και ξυλανάσες επάγουν άμυνες στα φυτά.

### 1.5.2 *Fusarium solani* K

Το 2005, οι Kavroutakis et al., παρατήρησαν την ικανότητα ενός οργανικού φυτικού υποστρώματος, προϊόν θερμόφιλης βιοαποικοδόμησης στέμφυλων οινοποιίας και στερεών αποβλήτων ελαιουργίας, να περιορίζει την εξάπλωση του παθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum f.sp. radices-lycopersici* στις ρίζες φυτών τομάτας σε σχέση με φυτά που είχαν αναπτυχθεί σε υπόστρωμα τύρφης. Δύο χρόνια αργότερα, το 2007, οι ίδιοι ερευνητές, με ημικλεκτικά υποστρώματα, απομόνωσαν ένα στέλεχος του γένους *Fusarium* από ρίζες φυτών τομάτας που είχαν αναπτυχθεί στο ίδιο κομποστοποιημένο υλικό αναμεμιγμένο με τύρφη. Το στέλεχος αυτό που αναφέρεται ως *Fysarium solani* K (Fs-k) ήταν ικανό να επάγει διασυστηματική ανθεκτικότητα (ISR) ενάντια στον παθογόνο μύκητα *Septoria lycopersici* που προσβάλλει τα φύλλα της τομάτας και δρα ανταγωνιστικά ως προς τον παθογόνο μύκητα του εδάφους *Fusarium oxysporum f.sp. radices-lycopersici* (FORL).

Είναι πιθανό, ο μύκητας Fsk να αποτελεί ένα στέλεχος το οποίο ανταγωνίζεται το παθογόνο FORL διεκδικώντας το ίδιο διαθέσιμο υπόστρωμα. Ίσως πάλι να ασκεί επίδραση στη βιωσιμότητα του παθογόνου και την ικανότητα βλάστησης των σπορίων του εξαιτίας της σύνθεσης μυκητοκτόνων ενώσεων.

Ο μύκητας Fsk είναι ικανός να διεισδύσει στις ρίζες του φυτού και να αναπτύσσεται στο φλοιό της ρίζας 15 ημέρες μετά τον εμβολιασμό του όπως και να εισχωρεί στους ηθμαγγειώδεις σωλήνες διαβιώντας ως ενδόφυτο. Η ικανότητα αποικισμού των ηθμαγγειωδών σωλήνων ωστόσο, είναι κάτι που χαρακτηρίζει τους μύκητες που αποτελούν παθογόνα των ριζών και για το λόγο αυτό, η δυνατότητα ωφέλιμου στελέχους να αναπτύσσεται άφθονα και χωρίς να προκαλεί συμπτώματα ασθένειας στο φυτό δηλώνει μια ασυνήθιστη αλληλεπίδραση μεταξύ μικροβίου και φυτού.

### 1.5.3 *Fusarium oxysporum*

Ο μύκητας *Fusarium oxysporum* έχει μελετηθεί αρκετά, εξαιτίας της ικανότητάς του να προκαλεί ασθένειες σε σημαντικά από οικονομικής πλευράς φυτικά είδη. Ο μύκητας *F. oxysporum* ανήκει στην οικογένεια *Tuberculariaceae* της τάξης *Moniliales* των Ατελών Μυκήτων. Το γένος *Fusarium* sp αναγνωρίστηκε από το Γερμανό Wollenweber (1935), ο οποίος ανακάλυψε περίπου 1.800 είδη. Το 1954 οι Snyder και Hansen, χρησιμοποιώντας την μέθοδο της μονόσπορης καλλιέργειας, αναγνώρισαν επτά μόνο είδη *Fusarium*. Το σύστημα ταξινόμησης των Snyder και Hansen είναι αποδεκτό μέχρι σήμερα. Λόγο της μεγάλης μεταβλητότητας μέσα σε αυτό το γένος, είναι ένα από τα δυσκολότερα όλων των μυκητιακών ομάδων που διακρίνονται ταξινομικά (Alexopoulos και Mims, 1979). Οι αποικίες του μύκητα συνήθως αυξάνονται γρήγορα, είναι λευκές ή χρωματίζονται έντονα (ανάλογα με τα είδη) και μπορεί να έχουν ή να μην έχουν βαμβακώδες εναέριο μυκήλιο. Το χρώμα του θαλλού ποικίλει από υπόλευκο σε κίτρινο, καφετί, ρόδινο, κοκκινωπό ή με ιώδες σκίαση. Τα κονίδια είναι υαλώδη και μπορεί να διαιρεθούν σε τρεις ομάδες μακροκονίδια, μικροκονίδια και χλαμυδοσπόρια. Τα φυτοπαθογόνα στελέχη του μύκητα *F. oxysporum* προκαλούν κυρίως αδρομυκώσεις και σήψεις ριζών, λαιμού και στελέχους. Τα φυτοπαθογόνα στελέχη παρουσιάζουν εξειδίκευση σε ένα ξενιστή



ή σε μία μικρή ομάδα ξενιστών που συνήθως ανήκουν στην ίδια οικογένεια (Gordon T. R., Martyn R. D. 1997).

Το *Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici* είναι ένας φυτοπαθογόνος μύκητας που προσβάλλει, τις καλλιέργειες τομάτας, στην περιοχή του λαιμού και της ρίζας. Η πρώτη αναφορά της ασθένειας έγινε το 1969 στην Ιαπωνία. Το 1970 εμφανίστηκε σε ξεχωριστές γεωγραφικές περιοχές της Ιαπωνίας, στο Ontario, Ohio, New Hampshire, California και στη Florida. Στη συνέχεια το παθογόνο εξαπλώθηκε και σήμερα η ασθένεια είναι συνηθισμένη σε περιοχές, που υπάρχει καλλιέργεια τομάτας (ΗΠΑ, Καναδά, Ευρώπη, Ισραήλ) (Liane et al, 1999). Στην Ελλάδα η πρώτη αναφορά της ασθένειας έγινε το 1981 σε θερμοκήπια του Ρεθύμνου, λίγο αργότερα στην Ιεράπετρα και στα Χανιά (Βακαλουνάκης, 2010).

Τα συμπτώματα που προκαλεί ο μύκητας *F. oxysporum f.sp. radicis-lycopersici* (FORL), ποικίλουν ανάλογα με τον τρόπο καλλιέργειας του φυτού, ανάλογα με το βλαστικό στάδιο του φυτού και ανάλογα με το φυτικό μέρος που προσβάλλεται. Ο μύκητας εισβάλλει από πληγές και φυσικά ανοίγματα που δημιουργούνται από τις αναδυόμενες ρίζες, οπότε η προσβολή του μύκητα ξεκινάει από το ριζικό σύστημα, προκαλώντας πολυάριθμες σκούρες καστανές νεκρώσεις που σιγά - σιγά εξελίσσονται σε ένα γενικό καστανό μεταχρωματισμό των ριζών και τελικά οδηγούν το ριζικό σύστημα σε σήψη (Zhang et al, 2011, Blancard, 1994). Το προσβεβλημένο ριζικό σύστημα σαπίζει εντελώς και εμφανίζονται καστανά έλκη. Καφέ νεκρώσεις είναι εμφανείς στην αρχή των πλευρικών ριζών. Τα αρχικά συμπτώματα που προκαλούνται από τον *F. oxysporum f.sp. radicis-lycopersici*, σε σπορόφυτα τομάτας είναι νανισμός, πρόωρη απώλεια των κοτυληδόνων και των κατώτερων φύλλων (Zhang et al, 2011).

## 1.6 ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ

Τα φυτά, η πηγή της τροφής του ανθρώπου και των ζώων, προσβάλλονται από ένα μεγάλο αριθμό διαφόρων κατηγοριών φυτοπαράσιτων. Περίπου 100.000 ασθένειες προκαλούνται από παθογόνους μικροοργανισμούς και άλλα παθογόνα αίτια, όπως οι μύκητες, τα βακτήρια, οι ιοί. Οι φυτοπαθογόνοι μύκητες και τα βακτήρια προκαλούν πολύ σοβαρές ζημιές τόσο στον αγρό όσο και στα αποθηκευμένα γεωργικά προϊόντα. Μερικοί από τους μύκητες μπορούν να προκαλέσουν ολοκληρωτική καταστροφή στην καλλιέργεια. Η φυτοπροστασία στοχεύει στην αποκατάσταση της οικολογικής ισορροπίας, μέσω της οποίας ο πληθυσμός των επιζήμιων, για τα καλλιεργούμενα φυτά, εντόμων και παθογόνων μικροοργανισμών να διατηρείται σε τέτοια επίπεδα, ώστε να μη δημιουργούνται προβλήματα οικονομικής σημασίας από αυτά.

### Βιολογικός έλεγχος παρασιτικών ασθενειών

Ο βιολογικός έλεγχος παρασιτικών ασθενειών των φυτών σχετίζεται με τη μείωση του μολύσματος ή της δραστηριότητας του παθογόνου, που περιορίζει την εκδήλωση της ασθένειας, με τη χρήση ενός ή περισσότερων μικροοργανισμών. Δεν αποσκοπείται η ριζική καταστροφή του παθογόνου, αλλά η μείωση της πυκνότητας του μολύσματος και της δραστηριότητάς του σε τέτοιο βαθμό, ώστε η ασθένεια που θα προκαλέσει το παθογόνο να δημιουργεί ζημιά που δε θα ξεπερνά τα κατώτερα παραδεκτά οικονομικά συμφέροντα.

Οι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί ονομάζονται «ανταγωνιστές» επειδή παρεμβαίνουν στην ανάπτυξη του παθογόνου με τους εξής μηχανισμούς:

- (Τροφικός) ανταγωνισμός: Οι μικροοργανισμοί ανταγωνίζονται μεταξύ τους για τα βασικά θρεπτικά στοιχεία στο έδαφος και στην περιοχή της ριζόσφαιρας και φυλλόσφαιρας. Ο ανταγωνισμός μεταξύ των βιολογικών παραγόντων και του παθογόνου οδηγεί στη στέρηση θρεπτικών συστατικών στο παθογόνο και άρα στη μείωση της δράσης του.
- Αντιβίωση: Τα αντιβιοτικά είναι οργανικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους που παράγονται από τους εδαφογενείς μικροοργανισμούς και σε μικρές συγκεντρώσεις παρεμποδίζουν την ανάπτυξη ή άλλες μεταβολικές διεργασίες

διαφόρων μικροοργανισμών. Ο μύκητας *Trichoderma harzianum* παράγει διάφορα αντιβιοτικά (π.χ. γλυοβιρίνη και γλυτοτοξίνη) εναντίον των μυκήτων *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* και *Sclerotium rolfsii*. Βακτήρια του γένους *Bacillus* παράγουν ιουρίνες εναντίον των μυκήτων *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum* και *Rhizoctonia solani*.

- Παρασιτισμός (οι μικροοργανισμοί τρέφονται σε βάρος του παθογόνου): Οι μικροοργανισμοί παράγοντας ειδικά ένζυμα ή πτητικές ουσίες με μυκητοκτόνες ιδιότητες, προκαλούν κυτταρόλυση άλλων οργανισμών.
- Αποικισμός: Ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται και αποικίζει τη φυτική επιφάνεια και έτσι προστατεύει το φυτό μη προσφέροντας απαραίτητο χώρο στο παθογόνο για να αναπτυχθεί.
- Ανοσοποίηση: Είναι η λειτουργία της βιολογικής ή βιοχημικής διέγερσης μηχανισμών ανοχής, ώστε το φυτό να καθίσταται ανθεκτικό σε περισσότερα του ενός παθογόνου.

Ανταγωνιστικά βακτήρια: Βακτηριακά παράσιτα μυκήτων δεν είναι γνωστά, ωστόσο υπάρχουν πολλές περιπτώσεις ανταγωνισμού μεταξύ βακτηρίων και μυκήτων με τελικό αποτέλεσμα την παρεμπόδιση εγκατάστασης του παθογόνου μύκητα. Το πιο γνωστό βακτήριο στη βιβλιογραφία είναι τα είδη *Bacillus spp* που ανταγωνίζεται με επιτυχία πολλά παθογόνα βακτήρια και μύκητες.

Η έμφαση στην έρευνα και την πρακτική του βιολογικού ελέγχου έχει αυξηθεί σταθερά τα πρόσφατα έτη και η ανάπτυξη μιας ολοκληρωμένης προσέγγισης μπορεί να ενισχύσει αρκετά την οικονομική αποτελεσματικότητα του βιολογικού ελέγχου σε ορισμένες περιοχές. Ο βιολογικός έλεγχος είναι ο άμεσος ή έμμεσος χειρισμός από τα άτομα των ζωντανών φυσικών παραγόντων ελέγχου, για την αύξηση της αποτελεσματικότητάς τους. Πάρα πολλά είδη μυκήτων και βακτηρίων που χρησιμοποιούνται ως ανταγωνιστές ασκούν βιολογική επίδραση σε ένα ή περισσότερα φυτοπαθογόνα.

Πολλές ψευδομονάδες παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες, σιδηροφόρα ( μόρια μικρό χηλικού σιδήρου ), όπως πυοβερδίνη και κινολοβακτίνη ( Mossialos & Amoutzias 2007), έξι κατηγορίες αντιβιοτικών ενώσεων, κυκλικά λιποπεπτίδια, υδροκυάνιο ( Hass και Defago 2005 ; Gross και Loper 2009 ). Πρόκειται για ουσίες

που συμβάλλουν σε δραστηριότητες βιολογικού ελέγχου. Είναι ενδιαφέρον ότι μερικοί δευτερογενείς μεταβολίτες δεν εμπλέκονται μόνο στο βιολογικό έλεγχο έναντι φυτοπαθογόνων αλλά μπορούν να εφαρμοστούν στην ιατρική, π.χ. σαφρακίνη ως αντικαρκινικός παράγοντας ή πυρρολονιτρίνης ως τοπικό αντιμυκητιασικό για ανθρώπινη χρήση (Gross και Loper 2009). Η αλληλουχία του γονιδιώματος της *P. entomophila* αποκάλυψε ένα μεγάλο αριθμό δευτερογενών μεταβολιτών (Vodovar et al. 2006). Λαμβάνοντας υπόψη το παραπάνω είναι εύλογο να υποθέσουμε πως η *P. entomophila* θα μπορούσε να επιδείξει ισχυρή δράση βιολογικού ελέγχου κατά φυτοπαθογόνων που μοιράζονται το ίδιο ενδιαίτημα π.χ. ριζόσφαιρα.

## 1.7 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το βακτήριο *P. entomophila* το οποίο είναι ικανό να μολύνει δια στόματος και να σκοτώνει την *Drosophila melanogaster* καθώς και αρκετά είδη εντόμων γεγονός που το καθιστά ικανό εντομοπαθογόνο βακτήριο. Η *P. entomophila* παράγει ένα μεγάλο αριθμό δευτερογενών μεταβολιτών και πιθανών παραγόντων παθογένειας με τους οποίους θα μπορούσε να συμβάλλει στην βιολογική καταπολέμηση μυκήτων. Με τον όρο βιολογική καταπολέμηση εννοείται η μείωση της επιβίωσης ή της δραστηριότητας ενός εχθρού ή παθογόνου σαν αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ ζωντανών οργανισμών (Burpee 1990). Η υπόθεση αυτή αποτέλεσε το σκοπός της παρούσας εργασίας, στην οποία χρησιμοποιήθηκε ένα στέλεχος άγριου τύπου *P. entomophila*, καθώς και τα μεταλλαγμένα στελέχη  $\Delta gacA/pnf$ ,  $\Delta pnf$ ,  $\Delta gacA$  τα οποία έχουν χάσει την ικανότητα να παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες.

Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν είναι τα εξής:

1. *In vitro* έλεγχος της ανταγωνιστικής δράσης της *P. entomophila* και μυκήτων σε τρυβλία με κοινό θρεπτικό υλικό ανάπτυξης.
2. Έλεγχος της αναστολής της βλαστητικής αύξησης και της αναπαραγωγικής ικανότητας του μύκητα παρουσία υπερκειμένου της *P. entomophila*.
3. Εξακρίβωση της ικανότητας δευτερογενών μεταβολιτών να αποτελούν παράγοντα ανταγωνισμού για τους μύκητες
4. Διερεύνηση της αναστολής των μυκήτων από την *P. aeruginosa*.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΣΤΕΛΕΧΗ ΚΑΙ ΜΥΚΗΤΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ

Όλα τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία βρίσκονται κατηγοριοποιημένα στον Πίνακα 1.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ
<i>Pseudomonas entomophila</i> (Pe)	Άγριος τύπος
$\Delta gacA$	Εξάλειψη του <i>gacA</i> γονιδίου της <i>Pe</i>
$\Delta pnf$	Εξάλειψη των <i>pnf</i> γονιδίων της <i>Pe</i>
$\Delta gacA/pnf$	Εξάλειψη των <i>pnf</i> και <i>gacA</i> γονιδίων
<i>Escherichia coli</i>	Στέλεχος DH5A
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Άγριος τύπος

Το στέλεχος *Escherichia coli* χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις για αρνητικό έλεγχο ενώ το στέλεχος *Pseudomonas aeruginosa* χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση κοινών χαρακτηριστικών ανάμεσα στο γένος *Pseudomonas*.

#### Stock γλυκερόλης των βακτηρίων

Τα κύτταρα προκειμένου να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα τοποθετούνται σε διάλυμα γλυκερόλης.

1. Τοποθέτηση 1,5 ml καλλιέργειας σε ένα eppendorf.
2. Φυγοκέντρηση 12000 rpm για 3 λεπτά.
3. Απόρριψη υπερκειμένου και προσθήκη 1ml φρέσκου θρεπτικού υλικού.
4. Vortex
5. Μεταφορά σε cryovial και προσθήκη 300-350μl γλυκερόλης.
6. Vortex
7. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα.

## 8. Διατήρηση στους -80° C.

Σημείωση: Η προσθήκη της γλυκερόλης γίνεται με αργό ρυθμό, σταγόνα-σταγόνα λόγω του μεγάλου ιξώδους. Κρίνεται απαραίτητο η γλυκερόλη να τοποθετηθεί σε όλο το μίγμα προκειμένου να προστατευτούν τα κύτταρα από λύση στους -80° C.

Στην παρούσα εργασία τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των καλλιιεργειών προέρχονταν από τις ήδη υπάρχουσες αναπτυγμένες καλλιέργειες, από τις οποίες είχαν δημιουργηθεί stock γλυκερόλης. Οι καλλιέργειες της *P. entomophila* αναπτύχθηκαν στους 30°C ενώ της *Escherichia coli* και της *Pseudomonas aeruginosa* στους 37°C.

Οι μύκητες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2

ΜΥΚΗΤΑΣ	ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ
<i>Fusarium oxysporum f.sp. radiacis – lycopersici</i>	<b>FORL</b>	Παθογόνος
<i>Fusarium oxysporum f.sp. raphani</i>	<b>FOR</b>	Παθογόνος
<b>Fusarium solani K</b>	<b>FsK</b>	Μη παθογόνος

### Αποθήκευση και συντήρηση μυκήτων

Για την αποθήκευση και συντήρηση των μυκήτων, η πειραματική διαδικασία βασίστηκε στο πρωτόκολλο των Juarros *et al.* (Juarros *et al.*, 1993).

1. Οι μύκητες αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό στους 30° C για περίπου 5 με 6 μέρες.
2. Τέσσερα μικρά κομμάτια μυκήτων κόβονται με αποστειρωμένο νυστέρι, σε στείρες συνθήκες που εξασφαλίζονται από τη φλόγα του λύχνου.

3. Τα κομμάτια των μυκήτων μεταφέρονται σε cryovials. Για κάθε μύκητα προετοιμάστηκαν 2 cryovials.
4. Σε κάθε cryovial προστίθενται 1ml αποστειρωμένης 10% v/v γλυκερόλης. Απαιτείται vortex για την ομογενοποίησή τους.
5. Pre-cooling: επώαση στους 4° C για μια ώρα.
6. Αποθήκευση στους -80° C.

Η μέθοδος παγώματος των μυκήτων που χρησιμοποιείται καλείται “medium freezing”.

Για την ανακαλλιέργεια μυκήτων από stock γλυκερόλης, η μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι “fast warming”.(Juarros *et al.*, 1993).

1. Τα cryovials με τους μύκητες από τους -80° C επωάζονται στους 37° C για 15 λεπτά.
2. Με αποστειρωμένη λαβίδα και σε στείρες συνθήκες αφαιρείται από το cryovial ένα κομμάτι μύκητα και τοποθετείται σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό.
3. Οι μύκητες επωάζονται στους 30° C για περίπου 5 με 6 μέρες.

Το “medium freezing” σε συνδυασμό με το “fast warming” είναι πολύ πιθανό να είναι ο καλύτερος τρόπος διατήρησης των καλλιιεργειών.

## 2.2 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

Τα θρεπτικά υλικά ανάπτυξης και συντήρησης των βακτηριακών στελεχών και μυκήτων είναι τα εξής:

### ΠΙΝΑΚΑΣ 3

PDB (Potato Dextrose Broth)
PDA (Potato Dextrose Agar)
Malt Extract
LB Broth



LB Agar
King' s B
King' s B Agar

### 2.3 ΔΟΚΙΜΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΚΑΙ ΜΥΚΗΤΩΝ ΣΤΑ ΔΙΑΦΟΡΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ.

Αρχικά πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια των μυκήτων FORL, FOR και Fsk σε θρεπτικά υποστρώματα LB, PDA, Malt Extract ακολουθώντας τη μέθοδο Juarros *et al.*

Στη συνέχεια εξετάστηκε η ανάπτυξη της *P. entomophila* στα θρεπτικά υποστρώματα των μυκήτων PDA και Malt Extract. Θεωρήθηκε επιθυμητό η ανάπτυξη του βακτηρίου να πραγματοποιηθεί στο περιβάλλον του μύκητα.

1<sup>η</sup> Δοκιμή: Με τον αποστειρωμένο μικροβιολογικό κρίκο, σε στείρες συνθήκες στον πάγκο, που εξασφαλίζονται από τη φλόγα λύχνου, λαμβάνεται ποσότητα κυττάρων από το stock γλυκερόλης. Ακολουθώς, γίνεται επίστρωση της ποσότητας των κυττάρων με τον μικροβιολογικό κρίκο σε τρυβλία PDA και Malt Extract και επώαση στους 30° C. Στην αρχή της επίστρωσης οι μικροοργανισμοί είναι τόσο κοντά ο ένας στον άλλο, έτσι ώστε να μη δίνουν, όταν αναπτυχθούν ξεχωριστές αποικίες, καθώς όμως η επίστρωση προχωρεί, απομένουν στο σύρμα του νυκελοχρωμίου όλο και λιγότεροι μικροοργανισμοί και γι' αυτό οι μικροοργανισμοί που επιστρώνονται στην επιφάνεια του άγαρ είναι πιο απομακρυσμένοι μεταξύ τους. Οι μικροοργανισμοί αυτοί όταν πολλαπλασιασθούν δίνουν ξεχωριστές αποικίες.

2<sup>η</sup> Δοκιμή: Με τον αποστειρωμένο μικροβιολογικό κρίκο και σε στείρες συνθήκες λαμβάνεται ποσότητα κυττάρων από το stock γλυκερόλης. Πραγματοποιείται ενοφθαλμισμός του μικροβιολογικού κρίκου σε θρεπτικό υλικό LB Broth, στο οποίο η *P. entomophila* αναπτύσσεται κανονικά. Μετά από την ανάπτυξη του βακτηρίου

λαμβάνεται ποσότητα κυττάρων με τον μικροβιολογικό κρίκο και ακολουθεί επίστρωση σε τρυβλίο PDA και Malt Extract και επώαση στους 30° C.

3<sup>η</sup> Δοκιμή: Με τον αποστειρωμένο μικροβιολογικό κρίκο και σε στείρες συνθήκες λαμβάνεται ποσότητα κυττάρων από το stock γλυκερόλης. Πραγματοποιείται επίστρωση του βακτηρίου σε τυβλίο LB, στο οποίο η *P. entomophila* αναπτύσσεται κανονικά. Από την στερεή καλλιέργεια *P. entomophila* λαμβάνεται ποσότητα κυττάρων με τον μικροβιολογικό κρίκο και ακολουθεί επίστρωση σε τρυβλίο PDA και Malt Extract και επώαση στους 30° C. Επίσης από τη στερεή καλλιέργεια γίνεται επαναδιάλυση σε 0,5 ml PBS και τοποθέτηση 3 σταγόνων (5  $\mu$ l) σε τρυβλίο PDA και Malt Extract και επώαση στους 30° C.

## 2.4 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΗΣ *P. ENTOMOPHILA*

Για την μελέτη του ρυθμού αύξησης χρησιμοποιήθηκε βακτηριακό στέλεχος *Pe* αγρίου τύπου.

### Πρωτόκολλο

1. Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα *Pe* από stock γλυκερόλης και ενοφθαλμίζονται 10ml LB. Κάνουμε 2 υγρές καλλιέργειες για το στέλεχος. Ακολουθεί επώαση στους 30°C για 16 ώρες.
2. Γίνεται αραίωση των καλλιιεργειών 1:10 σε τελικό όγκο 10ml και χρησιμοποιούμε νερό. Μετράται η οπτική απορρόφηση των καλλιιεργειών στα 600nm (OD600).
3. Προσαρμόζονται οι καλλιέργειες, έτσι ώστε να έχουν οπτική απορρόφηση OD600=0,01. Προσθέσαμε 10<sup>7</sup>cfu/ml σε τελικό όγκο 100ml θρεπτικού μέσου LB.
4. Από αυτά τα 100ml, λαμβάνονται 50ml και τα προσθίθενται σε κωνική φιάλη των 500ml. Επώαση των καλλιιεργειών στους 30°C. Τα υπόλοιπα 50ml διατηρούνται στους 4°C.
5. Για την πρώτη μέτρηση της διαδικασίας, γίνεται αραίωση 1:10, προσθέτοντας 1ml από την κάθε καλλιέργεια σε 9ml απιονισμένο νερό. Πραγματοποιείται πολύ καλό vortex και μετράται η απορρόφηση στα 600nm. Σαν τυφλό

χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό. Επαναλαμβάνεται το ίδιο για όλες τις καλλιέργειες.

6. Γίνονται μετρήσεις κάθε ώρα, κάνοντας την ίδια αραίωση κάθε φορά. Σημειώνεται πάντα το χρονικό σημείο στο οποίο γίνεται η μέτρηση, δηλαδή πόσες ώρες έχουν περάσει από την έναρξη της επώασης των καλλιιεργειών.
7. Για να μην υπάρξει μεγάλο χρονικό κενό στις μετρήσεις μας, χρησιμοποιούνται και τα άλλα 50ml των καλλιιεργειών. Ξεκινάει την επώασή τους αμέσως μετά την τελευταία μέτρηση της πρώτης ομάδας. Με αυτό τον τρόπο την επόμενη μέρα είναι διαθέσιμες οι μετρήσεις των χρονικών σημείων, που σε αντίθετη περίπτωση θα χάνονταν κατά τη διάρκεια της νύχτας.
8. Γίνονται μετρήσεις για 1 ημέρα.

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται τέσσερις φορές

Η μικροβιακή αύξηση αντιπροσωπεύει την αύξηση στον αριθμό των μικροβιακών κυττάρων. Ο ρυθμός αύξησης είναι η μεταβολή του αριθμού των κυττάρων ή της κυτταρικής μάζας ανά μονάδα χρόνου. Κατά τον κύκλο διαίρεσης, όλα τα δομικά στοιχεία του κυττάρου διπλασιάζονται. Το διάστημα κατά το οποίο σχηματίζονται δύο κύτταρα από ένα προϋπάρχον ονομάζεται γενεά και ο χρόνος που απαιτείται για να πραγματοποιηθεί αυτό ονομάζεται χρόνος γενεάς. Ο χρόνος γενεάς δεδομένου οργανισμού εξαρτάται ως κάποιο βαθμό από το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται και από τις συνθήκες καλλιέργειας που εφαρμόζονται. Οι καλλιέργειες στις οποίες η αύξηση συντελείται σε θρεπτικό μέσο δεδομένου όγκου που συνεχώς μεταβάλλεται από τη δράση των αναπτυσσόμενων οργανισμών μέχρι να είναι πλέον ακατάλληλο για αύξηση λέγονται κλειστές καλλιέργειες. Για τη μελέτη του ρυθμού αύξησης χρησιμοποιήσαμε τα βακτηριακά στελέχη *Pe* αγρίου τύπου.

## **2.5 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ *P. ENTOMOPHILA* ΣΤΟΥΣ ΜΥΚΗΤΕΣ FORL, FOR ΚΑΙ FSK.**

1<sup>η</sup> Επέμβαση: Πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια της *P. entomophila* και της *E.coli* σε υγρό LB στους 30°C overnight και στους 37°C, αντίστοιχα και των μυκήτων σε τρυβλία PDA στους 25°C για 5 με 6 ημέρες. Λαμβάνονται 5 μl από κάθε καλλιέργεια

βακτηρίου και τοποθετούνται σε τριβλίο LB σε αντιδιαμετρικά σημεία. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια μυκήτων στο παραπάνω τρυβλίο μετά από 12 ώρες. Ακολουθεί επώαση του τρυβλίου στους 28° C, ενδιάμεση θερμοκρασία ανάπτυξης ανάμεσα στους μικροοργανισμούς. Η παρατήρηση και φωτογράφιση των τρυβλίων έγινε την 5<sup>η</sup> ημέρα ανάπτυξης του μύκητα. Όλες οι διαδικασίες και οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε στείρες συνθήκες που εξασφαλίζονται με χρήση απαγωγού εστίας. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται τρεις φορές για τον κάθε μύκητα.

2<sup>η</sup> Επέμβαση: Στην περίπτωση αυτή εκτελέστηκαν οι ίδιες διαδικασίες που αναφέρονται παραπάνω με την διαφορά ότι η τοποθέτηση των βακτηριακών στελεχών και των μυκήτων πραγματοποιήθηκαν ταυτόχρονα. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται τρεις φορές για τον κάθε μύκητα.

3<sup>η</sup> Επέμβαση: Πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια της *P. entomophila* και της *E.coli* σε υγρό LB στους 30°C και στους 37°C, αντίστοιχα. σε εκθετική φάση. Ύστερα από λίγες ώρες επώασης υπό ανάδευση τοποθετούνται σε erpedorf 100μl της υγρής καλλιέργειας και 900μl LB Broth. Πραγματοποιείται vortex και μέτρηση της απορρόφησης τα 600nm. Για το μηδενισμό του φωτόμετρου χρησιμοποιείται LB Broth. Η επιθυμητή OD= 0.6. Η ανακαλλιέργεια των μυκήτων έγινε σε τριβλία PDA στους 25°C για 5 με 6 ημέρες. Λαμβάνονται 5 μl από κάθε καλλιέργεια βακτηρίου και τοποθετούνται σε τρυβλίο LB σε αντιδιαμετρικά σημεία. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια μυκήτων στο παραπάνω τρυβλίο μετά από 12 ώρες. Ακολουθεί επώαση του τρυβλίου στους 28° C, ενδιάμεση θερμοκρασία ανάπτυξης ανάμεσα στους μικροοργανισμούς. Η παρατήρηση και φωτογράφιση των τρυβλίων έγινε την 5<sup>η</sup> ημέρα ανάπτυξης του μύκητα. Όλες οι διαδικασίες και οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε στείρες συνθήκες που εξασφαλίζονται με χρήση απαγωγού εστίας. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται τρεις φορές για τον κάθε μύκητα.

## 2.6 ΧΡΗΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΜΕΣΟΥ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΕΝΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΣΙΔΗΡΟΥ- King's B

Στα ακόλουθα πειράματα χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό με περιορισμένη συγκέντρωση σιδήρου, το King's B προκειμένου να επαχθεί τροφικός ανταγωνισμός, ο οποίος θα μπορούσε να οδηγήσει σε μείωση της ανάπτυξης του μύκητα.

### 2.6.1 Μέτρηση παραγωγής πυοβερδίνης.

Από υγρή καλλιέργεια της *P. entomophila* σε θρεπτικό υλικό King's B μεταφέρονται 1,5 ml καλλιέργειας σε erppendorf. Πραγματοποιείται φυγοκέντρωση για 2 λεπτά στις 12000 rpm. Το υπερκείμενο συλλέγεται και μετράται η απορρόφηση στα 405nm. Ως τυφλό χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό King's B. Η μέτρηση της πυοβερδίνης βασίστηκε στο νόμο Beer-Lambert:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c,$$

όπου  $\epsilon$ : ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης είναι  $1,4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  στα 405nm και  $b = 1 \text{ cm}$ .

### 2.6.2 Εκτίμηση της ανταγωνιστικής δράσης της *P. entomophila* στους μύκητες FORL, FOR και Fsk σε θρεπτικό King's B.

1<sup>η</sup> Επέμβαση: Πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια της *P. entomophila* και της *E. coli* σε υγρό King's B στους 30°C και στους 37°C αντίστοιχα, σε εκθετική φάση. Ύστερα από λίγες ώρες επώασης υπό ανάδευση τοποθετούνται σε erppendorf 100μl της υγρής καλλιέργειας και 900μl King's B. Πραγματοποιείται vortex και μέτρηση της απορρόφησης τα 600nm. Για το μηδενισμό του φωτόμετρου χρησιμοποιείται King's B. Η επιθυμητή OD = 0.6. Η ανακαλλιέργεια των μυκήτων έγινε σε τρυβλία King's B στους 25°C για 5 με 6 ημέρες. Λαμβάνονται 5 μl από κάθε καλλιέργεια βακτηρίου και τοποθετούνται σε τρυβλίο King's B σε αντιδιαμετρικά σημεία. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια μυκήτων στο παραπάνω τρυβλίο μετά από 12 ώρες. Ακολουθεί επώαση του τρυβλίου στους 28° C, ενδιάμεση θερμοκρασία ανάπτυξης ανάμεσα στους μικροοργανισμούς. Η παρατήρηση και φωτογράφιση των τρυβλίων έγινε την 5<sup>η</sup> ημέρα ανάπτυξης του μύκητα. Όλες οι διαδικασίες και οι

χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε στείρες συνθήκες που εξασφαλίζονται με χρήση απαγωγού εστίας. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται τρεις φορές για τον κάθε μύκητα.

2<sup>η</sup> Επέμβαση: Στην περίπτωση αυτή εκτελέστηκαν οι ίδιες διαδικασίες που αναφέρονται παραπάνω με την διαφορά ότι η τοποθέτηση των βακτηριακών στελεχών και των μυκήτων πραγματοποιήθηκαν ταυτόχρονα. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται τρεις φορές για τον κάθε μύκητα.

## **2.7 ΧΡΗΣΗ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟΥ ΤΗΣ *P. ENTOMOPHILA* ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΜΟΥ**

Δημιουργούνται 2 υγρές καλλιέργειες της *P. entomophila* σε King's B. Στη μία καλλιέργεια τα βακτήρια αναπτύσσονται overnight, μέχρι τη φάση στασιμότητας και στην άλλη μέχρι την εκθετική φάση. Στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρωση για 20 λεπτά στις 4000 rpm. Το υπερκείμενο συλλέγεται και διέρχεται από φίλτρο 0,22μm. Το 1/10 του φιλτραρισμένου υπερκειμένου χρησιμοποιείται για την παρασκευή King's B άγαρ. Η προσθήκη του υπερκειμένου γίνεται στο χρονικό σημείο στο οποίο το King's B άγαρ έχει κρύνει από την αποστείρωση προκειμένου να μην καταστραφούν οι μεταβολίτες από την υψηλή θερμοκρασία. Στα παραπάνω τρυβλία πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια του μύκητα. Ως control χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία King's B χωρίς ποσότητα υπερκειμένου στα οποία πραγματοποιήθηκε ανακαλλιέργεια του μύκητα. Όλες οι διαδικασίες και οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε στείρες συνθήκες που εξασφαλίζονται με χρήση απαγωγού εστίας. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται τρεις φορές για τον κάθε μύκητα.

## 2.8 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟΥ ΤΗΣ *P. ENTOMOPHILA*

1<sup>η</sup> Επέμβαση:

1. Οι μύκητες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ανακαλλιιεργήθηκαν και διατηρήθηκαν στους 25° C σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό PDA. Λαμβάνεται 1 plag από την εκθετική φάση του μύκητα.
2. Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα από stock γλυκερόλης και ακολουθεί ενοφθαλμισμός 10ml King's B (προκαλλιέργεια). Επώαση για 16 ώρες στους 30° C. Με την προκαλλιέργεια ενοφθαλμίστηκαν 490ml King's B (1/50) και επωάστηκαν για περίπου 3 ώρες, μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να είναι μεταξύ 0.6-1. Η καλλιέργεια τοποθετήθηκε σε δοχείο με νερό για 15 λεπτά προκειμένου να κρυώσει. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 6000 rpm. Στο συγκεκριμένο υπερκείμενο είναι παρόντα μερικά κύτταρα που ξέφυγαν από τη φυγοκέντρηση.
3. Σε υγρές καλλιέργειες που περιέχουν 50 ml PDB τοποθετούνται ταυτόχρονα 1 plag μύκητα και 5ml υπερκειμένου, το οποίο περιέχει μερικά κύτταρα του βακτηρίου, σε στείρες συνθήκες στο laminar.
4. Οι παραπάνω φιάλες επωάζονται στους 28° C για πέντε μέρες με ανάδευση (150 στρ/min). Ακολουθεί μέτρηση των κονιδίων.
5. Η απομόνωση των κονιδίων του μύκητα έγινε μετά από διήθηση της καλλιέργειας μέσα από τουλουπάνι και φυγοκέντρηση στις 7500 rpm για 5 λεπτά. Το ίζημα-κονίδια διαλυτοποιείται σε 1000μl απιονισμένο νερό. Η μέτρηση των κονιδίων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer στο μικροσκόπιο Leica. Η συγκέντρωση των κονιδίων στο διήθημα προκύπτει από τον τύπο:  
$$\alpha \times 4 \times 25 \times 10^4 \times \text{συντελεστής αραίωσης} = \text{κονίδια} / \text{ml.}$$
  
όπου α: μέσος όρος κονιδίων ανά τετράγωνο

Σημείωση: Όλες οι διαδικασίες και οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε στείρες συνθήκες που εξασφαλίζονται με χρήση απαγωγού εστίας. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται τρεις φορές για τον κάθε μύκητα.

2<sup>η</sup> Επέμβαση: Η διαδικασία που πραγματοποιήθηκε είναι όμοια με την παραπάνω με την διαφορά ότι τα βακτήρια δεν βρίσκονταν σε εκθετική φάση αλλά στη φάση στασιμότητας. Ποσότητα κυττάρων από το stock γλυκερόλης ενοφθαλμίζονται σε 10ml King's και η καλλιέργεια επωάζεται στους 30° C overnight.

3<sup>η</sup> Επέμβαση:

1. Οι μύκητες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ανακαλλιεργήθηκαν και διατηρήθηκαν στους 25° C σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό PDA. Λαμβάνεται 1 plag από την εκθετική φάση του μύκητα.
2. Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα από stock γλυκερόλης και ακολουθεί ενοφθαλμισμός 10ml King's B (προκαλλιέργεια). Επώαση για 16 ώρες στους 30° C. Με την προκαλλιέργεια ενοφθαλμίστηκαν 490ml King's B (1/50) και επώαστηκαν για περίπου 3 ώρες, μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να είναι μεταξύ 0.6-1. Η καλλιέργεια τοποθετήθηκε σε δοχείο με νερό για 15 λεπτά προκειμένου να κρυώσει. Πραγματοποιείται φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 6000 rpm. Το υπερκείμενο που συλλέγεται μετά τη φυγοκέντρωση, φιλτράρεται σε φίλτρο 0,22μm.
3. Σε υγρές καλλιέργειες που περιέχουν 50 ml PDB τοποθετούνται ταυτόχρονα 1 plag μύκητα και 5ml υπερκείμενου, το οποίο περιέχει μερικά κύτταρα του βακτηρίου, σε στείρες συνθήκες στο laminar.
4. Οι παραπάνω φιάλες επωάζονται στους 28° C για πέντε μέρες με ανάδευση (150 στρ/min). Ακολουθεί μέτρηση της βιομάζας και κονιδίων.
5. Η απομόνωση των κονιδίων του μύκητα έγινε μετά από διήθηση της καλλιέργειας μέσα από τουλουπάνι και φυγοκέντρωση στις 7500 rpm για 5 λεπτά. Το ίζημα-κονίδια διαλυτοποιείται σε 1000μl απιονισμένο νερό. Η μέτρηση των κονιδίων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της αντικειμενοφορου πλάκας Neubauer στο μικροσκόπιο Leica. Η συγκέντρωση των κονιδίων στο διήθημα προκύπτει από τον τύπο:  
$$a \times 4 \times 25 \times 10^4 \times \text{συντελεστής αραίωσης} = \text{κονίδια} / \text{ml.}$$
  
όπου α: μέσος όρος κονιδίων ανά τετράγωνο



6. Από την παραπάνω διήθηση λαμβάνεται το σώμα του μύκητα και ζυγίζεται (fresh weight). Ακόμη το σώμα παραμένει για επώαση 1 μέρα στους 100° C και ξαναζυγίζεται (dry weight)..

## 2.9 ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΑ

Τα αντιβιοτικά που προστέθηκαν στα θρεπτικά υποστρώματα, στις περιπτώσεις που η χρήση τους ήταν απαραίτητη, καθώς και οι συγκεντρώσεις τους φαίνονται στον Πίνακα 4.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4

ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ STOCK	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
<i>Δpvf</i>	ΓΕΝΤΑΜΥΚΙΝΗ	40mg/ml	25μg/ml
<i>ΔgacA</i>	ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗ	20mg/ml	10μg/ml
<i>ΔgacA/pvf</i>	both		

Δοκιμάστηκε η ανάπτυξη των μεταλλαγμάτων σε θρεπτικό υλικό με και χωρίς αντιβιοτικό. Κύτταρα από stock γλυκερόλης λαμβάνονται με μικροβιολογικό κρίκο και στη συνέχεια επιστρώνονται σε τρυβλία King's B με και χωρίς αντιβιοτικό. Η ύπαρξη αποικιών ελέγχθηκε δυο ημέρες αργότερα. Πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια της *P. entomophila* του κάθε μεταλλάγματος και της *E.coli* σε υγρό King's B στους 30°C overnight και στους 37°C, αντίστοιχα και των μυκήτων σε τρυβλία PDA στους 25°C για 5 με 6 ημέρες. Λαμβάνονται 5 μl από κάθε καλλιέργεια βακτηρίου και τοποθετούνται σε τρυβλίο King's B σε αντιδιαμετρικά σημεία. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια μυκήτων στο παραπάνω τρυβλίο μετά από 12 ώρες. Ακολουθεί επώαση του τρυβλίου στους 28° C, ενδιάμεση θερμοκρασία ανάπτυξης ανάμεσα στους μικροοργανισμούς. Η παρατήρηση και φωτογράφιση των

τρυβλίων έγινε την 5<sup>η</sup> ημέρα ανάπτυξης του μύκητα. Όλες οι διαδικασίες και οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε στείρες συνθήκες που εξασφαλίζονται με χρήση απαγωγού εστίας. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται τρεις φορές για τον κάθε μύκητα και το κάθε μετάλλαγμα.

## **2.10 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ *P. ENTOMOPHILA* ΚΑΙ ΤΗΣ *P. AERUGINOSA* ΣΤΟΥΣ ΜΥΚΗΤΕΣ FORL, FOR ΚΑΙ FSK.**

Πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια της *P. entomophila*, *P. aeruginosa* και της *E.coli* στους 30°C και στους 37°C, αντίστοιχα. σε 10ml King's B (προκαλλιέργεια). Επώαση για 16 ώρες στους 30° C. Με την προκαλλιέργεια ενοφθαλμίστηκαν 490ml King's B (1/50) και επώσθηκαν για περίπου 3 ώρες, μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να είναι μεταξύ 0.6-1. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε King's B. Η ανακαλλιέργεια των μυκήτων έγινε σε τρυβλία King's B στους 25°C για 5 με 6 ημέρες. Λαμβάνονται 5 μl από κάθε καλλιέργεια βακτηρίου και τοποθετούνται σε τρυβλίο King's B σε αντιδιαμετρικά σημεία. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια μυκήτων στο παραπάνω τρυβλίο μετά από 12 ώρες. Ακολουθεί επώαση του τρυβλίου στους 28° C, ενδιάμεση θερμοκρασία ανάπτυξης ανάμεσα στους μικροοργανισμούς. Η παρατήρηση και φωτογράφιση των τρυβλίων έγινε την 5<sup>η</sup> ημέρα ανάπτυξης του μύκητα. Όλες οι διαδικασίες και οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε στείρες συνθήκες που εξασφαλίζονται με χρήση απαγωγού εστίας. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται τρεις φορές για τον κάθε μύκητα.

## **2.11 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ FSK ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟΥ ΤΗΣ *P. AERUGINOSA*.**

1. Ο μύκητας Fsk ανακαλλιεργήθηκε και διατηρήθηκε στους 25° C σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό PDA. Λαμβάνεται 1 plag από την εκθετική φάση του μύκητα.

2. Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα από stock γλυκερόλης και ακολουθεί ενοφθαλμισμός 10ml King's B. Επώαση για 24 ώρες στους 30° C. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 6000 rpm. Το υπερκείμενο συλλέγεται και φιλτράρεται σε φίλτρο 0,22μm.
3. Σε υγρές καλλιέργειες που περιέχουν 50 ml PDB τοποθετούνται ταυτόχρονα 1 plag μύκητα και 5ml υπερκειμένου.
4. Οι παραπάνω φιάλες επωάζονται στους 28° C για πέντε μέρες με ανάδευση (150 στρ/min). Ακολουθεί μέτρηση της βιομάζας και κονιδίων.
5. Η απομόνωση των κονιδίων του μύκητα έγινε μετά από διήθηση της καλλιέργειας μέσα από τουλουπάνι και φυγοκέντρηση στις 7500 rpm για 5 λεπτά. Το ίζημα-κονίδια διαλυτοποιείται σε 1000μl απιονισμένο νερό. Η μέτρηση των κονιδίων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer στο μικροσκόπιο Leica. Η συγκέντρωση των κονιδίων στο διήθημα προκύπτει από τον τύπο:  

$$a \times 4 \times 25 \times 10^4 \times \text{συντελεστής αραίωσης} = \text{κονίδια} / \text{ml.}$$
όπου α: μέσος όρος κονιδίων ανά τετράγωνο
6. Από την παραπάνω διήθηση λαμβάνεται το σώμα του μύκητα και ζυγίζεται (fresh weight). Ακόμη το σώμα παραμένει για επώαση 1 μέρα στους 100° C και ξαναζυγίζεται (dry weight).

Σημείωση: Όλες οι διαδικασίες και οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε στείρες συνθήκες που εξασφαλίζονται με χρήση απαγωγού εστίας. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται τρεις φορές.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 ΔΟΚΙΜΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΚΑΙ ΜΥΚΗΤΩΝ ΣΤΑ ΔΙΑΦΟΡΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ.

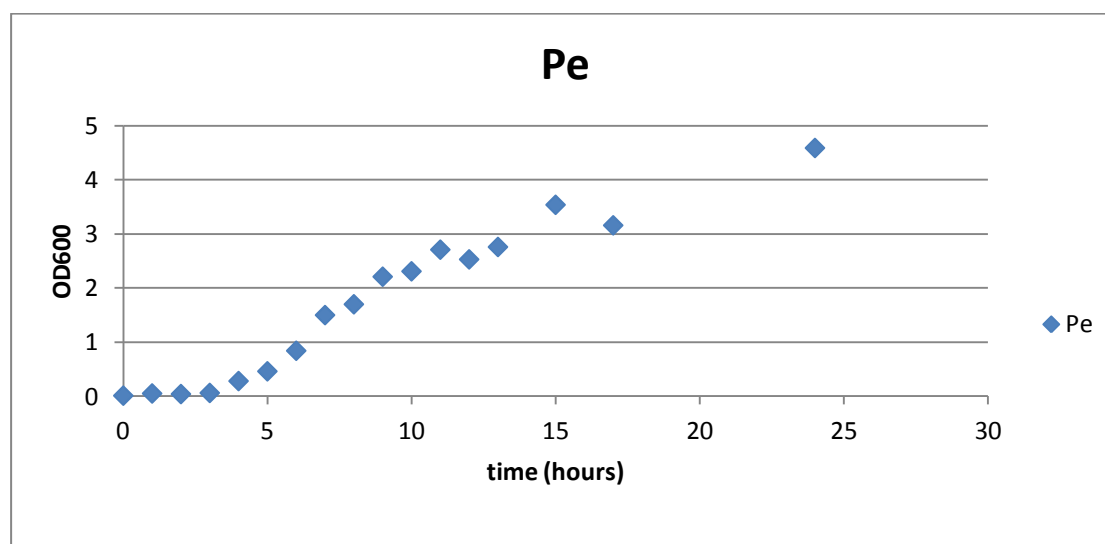
Αρχικά θέλαμε να εξετάσουμε τα θρεπτικά υλικά στα οποία μπορούν να αναπτυχθούν παράλληλα και η *P. entomophila* και οι μύκητες FORL, FOR, Fsk. Ξεκινώντας, λοιπόν από τα LB, PDA και Malt Extract, στόχος ήταν ένα θρεπτικό ανάπτυξης του μύκητα στο οποίο να μπορεί να αναπτυχθεί και η *P. entomophila*. Δοκιμάστηκε η ανάπτυξη του βακτηρίου από stock γλυκερόλης σε θρεπτικό άγαρ, ενοφθαλμισμός σε θρεπτικό και στη συνέχεια σε τρυβλίο και επαναδιάλυση των κυττάρων σε pbs. Κατά τη διεξαγωγή δοκιμών ανάπτυξης των μικροοργανισμών στα παραπάνω υποστρώματα, διαπιστώθηκε πως το κοινό θρεπτικό υλικό ανάπτυξης που θα χρησιμοποιηθεί για την διεξαγωγή των πειραμάτων είναι το LB. Δεν υφίσταται ανάπτυξη της *P. entomophila* στα θρεπτικά υλικά ανάπτυξης των μυκήτων, δηλαδή στο PDA και Malt Extract.

	LB	PDA	Malt
P. Entomophila	+	-	-
FORL	+	+	+
FOR APO ACE	+	+	+
Fsk	+	+	+

### 3.2 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Η μικροβιακή αύξηση αντιπροσωπεύει την αύξηση στον αριθμό των μικροβιακών κυττάρων. Ο ρυθμός αύξησης είναι η μεταβολή του αριθμού των κυττάρων ή της κυτταρικής μάζας ανά μονάδα χρόνου. Κατά τον κύκλο διαίρεσης, όλα τα δομικά στοιχεία του κυττάρου διπλασιάζονται. Το διάστημα κατά το οποίο σχηματίζονται δύο κύτταρα από ένα προϋπάρχον ονομάζεται γενεά και ο χρόνος που απαιτείται για να πραγματοποιηθεί αυτό ονομάζεται χρόνος γενεάς. Ο χρόνος γενεάς δεδομένου οργανισμού εξαρτάται ως κάποιο βαθμό από το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται και από τις συνθήκες καλλιέργειας που εφαρμόζονται. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, η *P. entomophila* είναι απαραίτητο να βρίσκεται σε συγκεκριμένη φάση ανάπτυξης. Προκειμένου να είναι γνωστό το χρονικό διάστημα το οποίο απαιτείται για να φτάσει το βακτήριο σε συγκεκριμένη φάση ανάπτυξης δημιουργήθηκε καμπύλη ανάπτυξης.

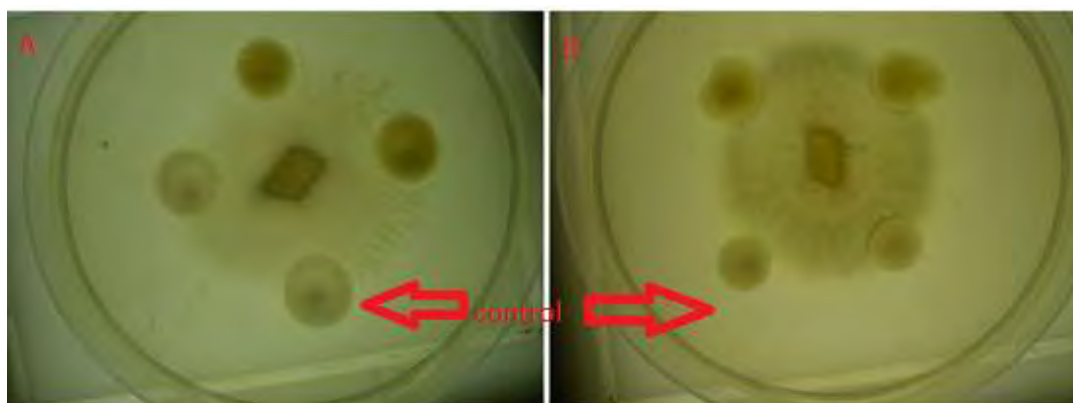
#### Μελέτη του ρυθμού ανάπτυξης των στελεχών *Pe*



Μελέτη του ρυθμού ανάπτυξης των στελεχών *Pe*

### 3.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ *P. ENTOMOPHILA* ΣΤΟΥΣ ΜΥΚΗΤΕΣ FORL, FOR ΚΑΙ FSK ΣΕ ΘΡΕΠΤΙΚΟ LB

Για να εξακριβωθεί εάν οι δευτερογενείς μεταβολίτες και οι πιθανοί παράγοντες παθογένειας που παράγονται από το βακτήριο στο τέλος της εκθετικής και στην αρχή της φάσης στασιμότητας, μπορούν να διαχυθούν στο τρυβλίο να εμποδίσουν την ανάπτυξη του μύκητα πραγματοποιήθηκαν τρεις επεμβάσεις στις οποίες άλλαζε κάθε φορά μία συνθήκη του πειράματος. Και στις τρεις επεμβάσεις που διεξήχθησαν, ανεξάρτητα από το εάν το βακτήριο βρισκόταν σε εκθετική ή σε στατική φάση και ανεξάρτητα από το εάν η τοποθέτηση στο ίδιο τρυβλίο έγινε ταυτόχρονα ή με διαφορά ώρας, οι υφές του μύκητα εμφανίζονται να αυξάνονται. Ο μύκητας ξεκάθαρα καταλαμβάνει το μέρος του χώρου γύρω από την αποικία του βακτηρίου. Αφού πλησιάσει αρκετά, εισέρχεται και διαπερνά την αποικία. Το αποτέλεσμα αυτό παρατηρήθηκε και στους τρεις μύκητες.



Φωτογραφίες της ανάπτυξης του μύκητα Forl(A) και Fsk(B) παρουσία καλλιέργειας *P. Entomophila* overnight. Οι υφές προσεγγίζουν τις καλλιέργειες και προσπαθούν να τις διαπεράσουν

### 3.4 ΧΡΗΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΦΤΩΧΟ ΣΕ ΣΙΔΗΡΟ- King's B

Οι μικροοργανισμοί ανταγωνίζονται για βασικά θρεπτικά στοιχεία στο κοινό τους περιβάλλον. Παρουσία του King's B αναπτύσσεται ανταγωνισμός για σίδηρο που θα μπορούσε να οδηγήσει σε μείωση του μύκητα λόγω έλλειψης απαραίτητων συστατικών. Ο σίδηρος δεν διατίθεται για τους μικροοργανισμούς σε αφομοιώσιμη μορφή. Υπάρχουν ειδικοί μηχανισμοί δέσμευσής του, τα σιδηροφόρα όπως η πυοβερδίνη που παράγεται από την *P. entomophila*. Η μείωση ανάπτυξης του μύκητα μπορεί να οφείλεται στους παρακάτω λόγους:

1. Δεν παράγουν μεγάλες ποσότητες σιδηροφόρων
2. Ανικανότητα χρησιμοποίησης σιδηροφόρων των βακτηρίων
3. Οι μικρές ποσότητες που παράγουν μπορεί να χρησιμοποιηθούν από τα βακτήρια.

#### 3.4.1 Μέτρηση παραγωγής πυοβερδίνης:

Δεδομένου ότι η *P. entomophila* παράγει το δευτερογενή μεταβολίτη πυοβερδίνη, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της συγκέντρωσης της που βασίστηκε στο νόμο Beer-Lambert.

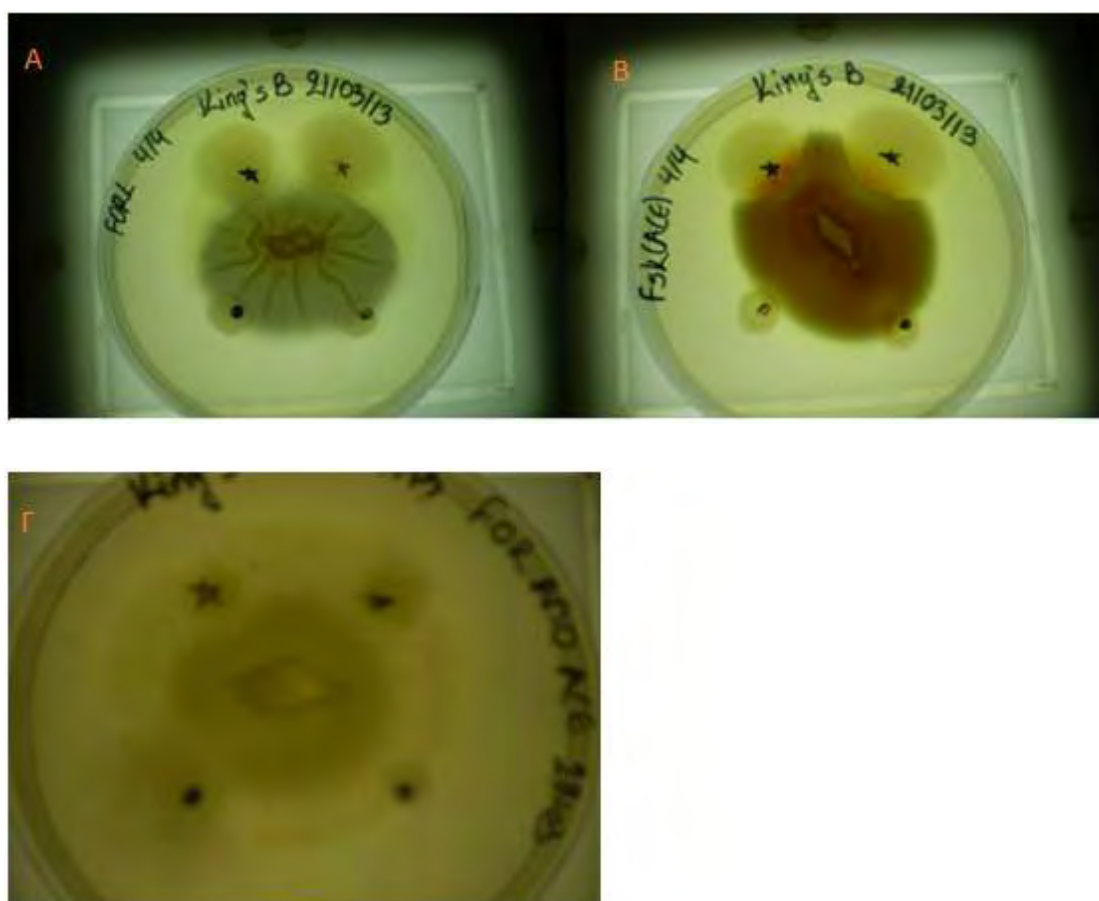
$$A = \epsilon \cdot b \cdot c,$$

Με συντελεστή μοριακής απόσβεσης είναι  $1,4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  στα 405nm και  $b=1\text{cm}$ , προκύπτει ότι η απορρόφηση της πυοβερδίνης στα 405 nm είναι 0,213

$$\text{Άρα } c = 15 \mu\text{M}$$

### 3.4.2 Εκτίμηση της ανταγωνιστικής δράσης της *P. entomophila* στους μύκητες FORL, FOR και Fsk σε θρεπτικό King's B.

Με αφετηρία το γεγονός ότι το βακτήριο παράγει τυοβερδίνη σε συγκέντρωση  $c=15\mu\text{M}$  σε θρεπτικό King's B ελέγχθηκε εάν οι μύκητες μπορούν να αναπτυχθούν σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου και παραγωγής σιδηροφόρων του βακτηρίου. Και στις δυο επεμβάσεις που διεξήχθησαν, ανεξάρτητα από το εάν η τοποθέτηση στο ίδιο τρυβλίο έγινε ταυτόχρονα ή με διαφορά ώρας, οι υφές του μύκητα αρχικά προσεγγίζουν την καλλιέργεια του βακτηρίου ενώ στη συνέχεια καταλαμβάνουν το μέρος του χώρου γύρω από την καλλιέργεια. Ο μύκητας εφάπτεται στην καλλιέργεια της *P. entomophila* ενώ αντίθετα διαπερνά και αναπτύσσεται πάνω από την καλλιέργεια της *E. coli* που αποτελεί το αρνητικό control. Η μερική αυτή αναστολή παρατηρείται και στους τρεις μύκητες.

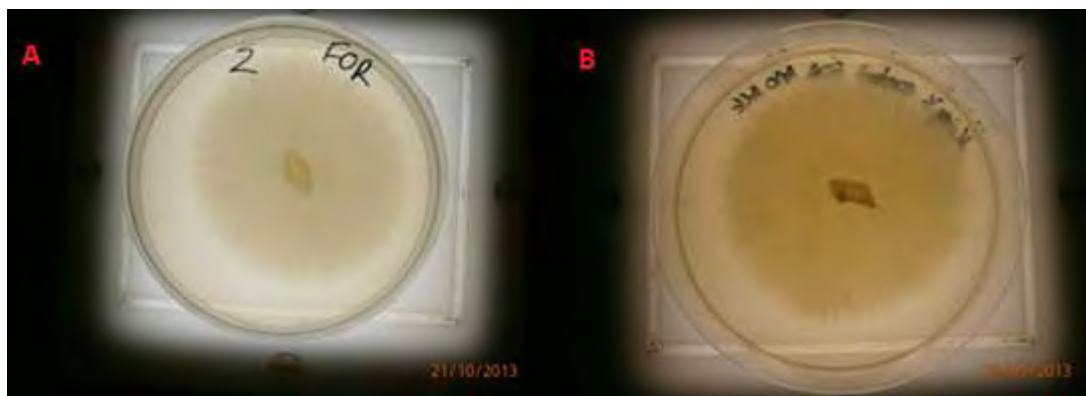




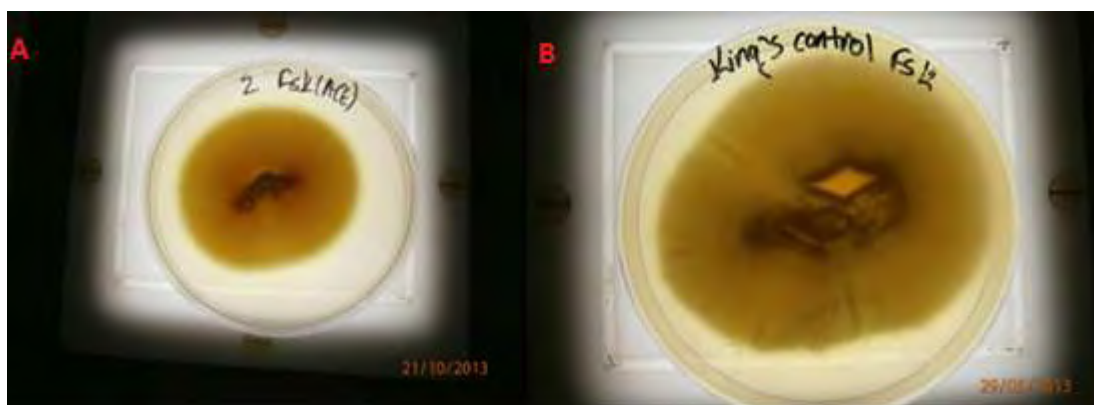
Φωτογραφίες των μυκήτων FORL (A) , FOR (Γ) και Fsk (B) σε θρεπτικό King's B παρουσία καλλιέργειας *P. Entomophila* ( \*) σε εκθετική φάση. Οι υφές δεν διέρχονται από τις καλλιέργειες *P. Entomophila*

### 3.5 ΧΡΗΣΗ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟΥ ΤΗΣ *P. ENTOMOPHILA* ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΜΟΥ

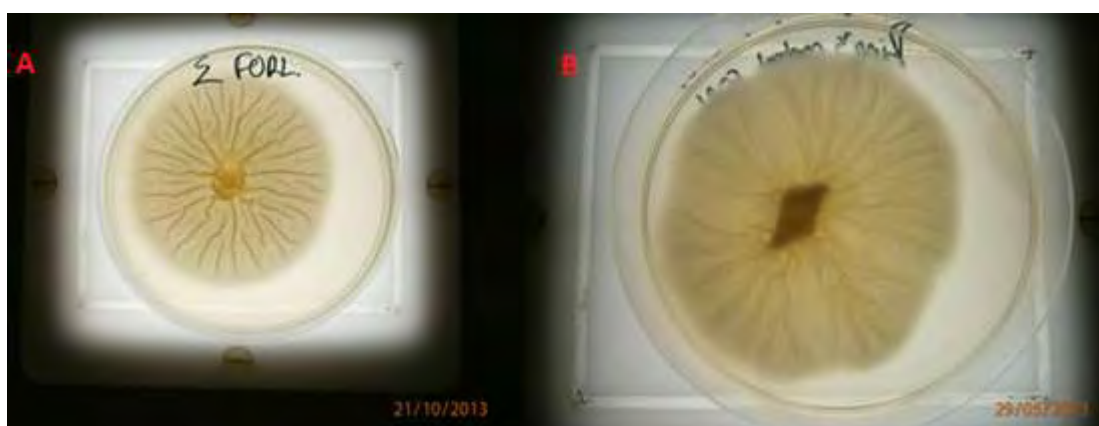
Οι δευτερογενείς μεταβολίτες παράγονται από την *P. entomophila* στο τέλος της εκθετικής και στην αρχή της φάσης στασιμότητας, εκκρίνονται από τα βακτηριακά κύτταρα και άρα εντοπίζονται στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης. Για το λόγο αυτό εξετάστηκε η ανάπτυξη των μυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία παρουσία υπερκείμενου του βακτηρίου από δύο τις φάσεις ανάπτυξης. Από τις παρατηρήσεις που γίνονταν κάθε μέρα μετά τις ανακαλλιέργειες, προκύπτει ότι οι μύκητες ανέπτυξαν μυκηλιακές υφές ανεξάρτητα από το αν το υπερκείμενο προερχόταν από καλλιέργεια του βακτηρίου σε εκθετική ή στατική φάση ανάπτυξης. Η παρατήρηση των μυκήτων γινόταν καθημερινά. Ο κάθε μύκητας εξαπλώνεται στο τρυβλίο και παρατηρείται ίδια ανάπτυξη στην πορεία του χρόνου σε σχέση με τα control.



Φωτογραφία του μύκητα FOR σε θρεπτικό King's B παρασκευασμένο με 1/10 υπερκείμενου στατικής φάσης (A) Φωτογραφία του μύκητα FOR σε θρεπτικό King's B- control (B)



Φωτογραφία του μύκητα Fsk σε θρεπτικό King's B παρασκευασμένο με 1/10 υπερκειμένου στατικής φάσης (A). Φωτογραφία του μύκητα Fsk σε θρεπτικό King's B- control (B)

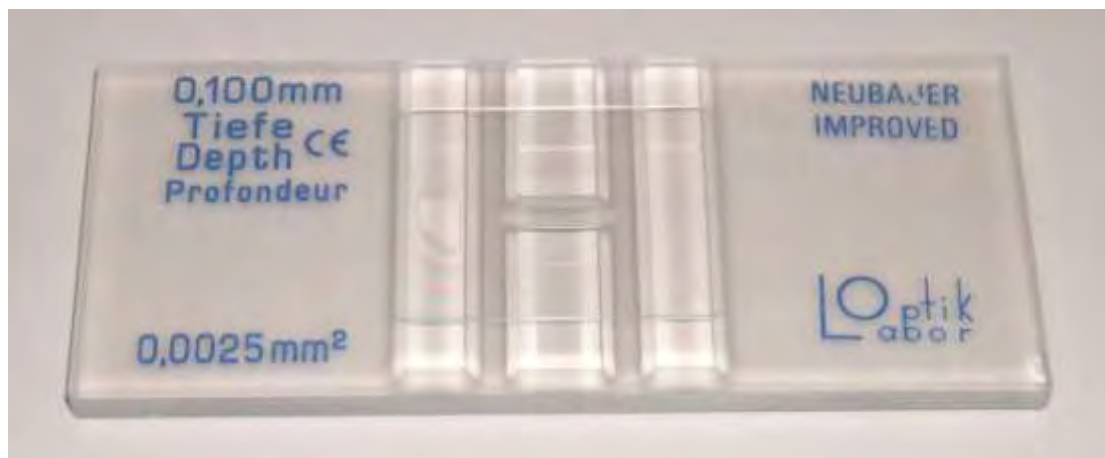


Φωτογραφία του μύκητα Forl σε θρεπτικό King's B παρασκευασμένο με 1/10 υπερκειμένου στατικής φάσης (A). Φωτογραφία του μύκητα Forl σε θρεπτικό King's B- control (B).

### 3.6 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟΥ ΤΗΣ *P. ENTOMOPHILA*

Με δεδομένο ότι στο παραπάνω πείραμα η παρουσία του υπερκειμένου δεν επιφέρει καμία αλλαγή στην ανάπτυξη του μύκητα, θεωρήθηκε απαραίτητο να πραγματοποιηθούν και άλλα πειράματα. Για το σκοπό αυτό προσδιορίστηκαν η βιομάζα του μύκητα καθώς και ο αριθμός των κονιδίων χρησιμοποιώντας την αντικειμενοφόρο πλάκα Neubauer. Επιπρόσθετα, γνωρίζοντας ότι οι δευτερογενείς μεταβολίτες παράγονται από την *P. entomophila* στο τέλος της εκθετικής και στην αρχή της φάσης στασιμότητας, εκκρίνονται και διαχέονται στο μέσο ανάπτυξης οι

μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν παρουσία κυττάρων και από τις δύο φάσεις ανάπτυξης και παρουσία υπερκειμένου από την εκθετική φάση.

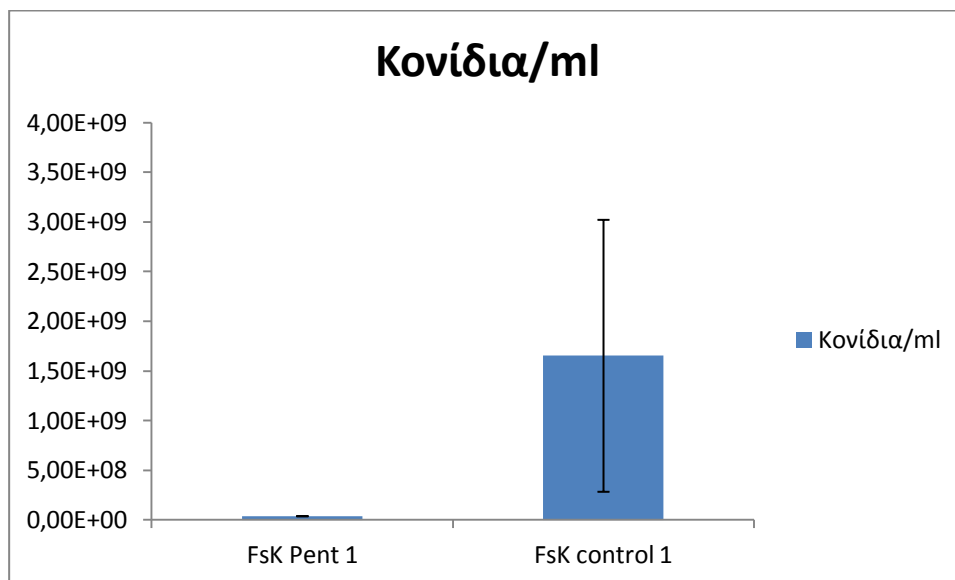


Αντικειμενοφόρος πλάκα Neubauer για τη μέτρηση κονιδίων στο μικροσκόπιο

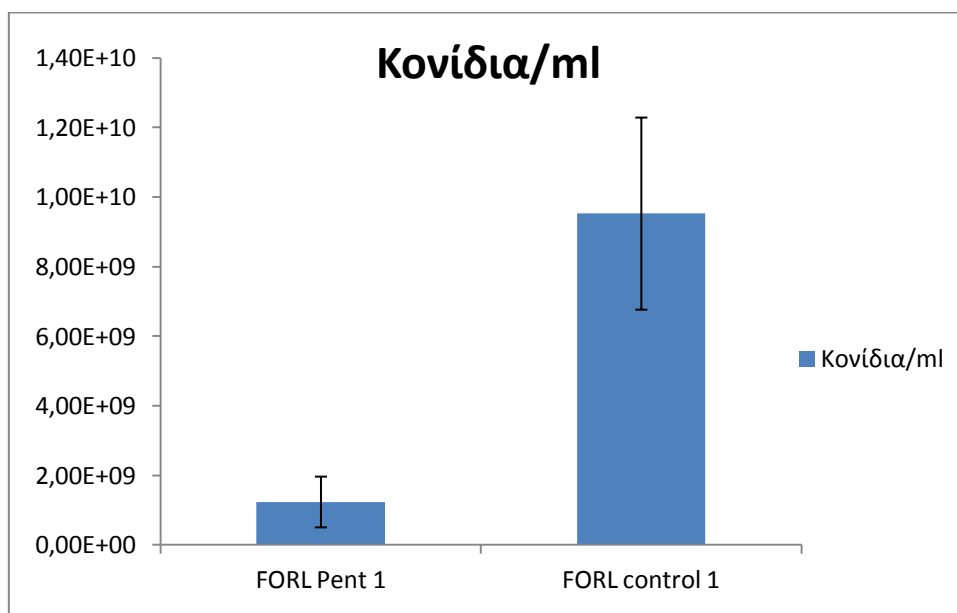
1<sup>η</sup> Επέμβαση:

Κατά τον προσδιορισμό των κονιδίων χρησιμοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες από κάθε μύκητα σε θρεπτικό PDB, στις οποίες προστέθηκε υπερκείμενο από καλλιέργεια *P. entomophila* εκθετικής φάσης σε King's B. Η μέτρηση των κονιδίων των μυκήτων χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία του διαγράμματος, στο οποίο εμφανίζονται τα μειωμένα ποσοστά σε σύγκριση με τα control. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν αναστολή στην αναπαραγωγική ικανότητα των μυκήτων παρουσία μερικών κυττάρων του βακτηρίου σε εκθετική φάση.

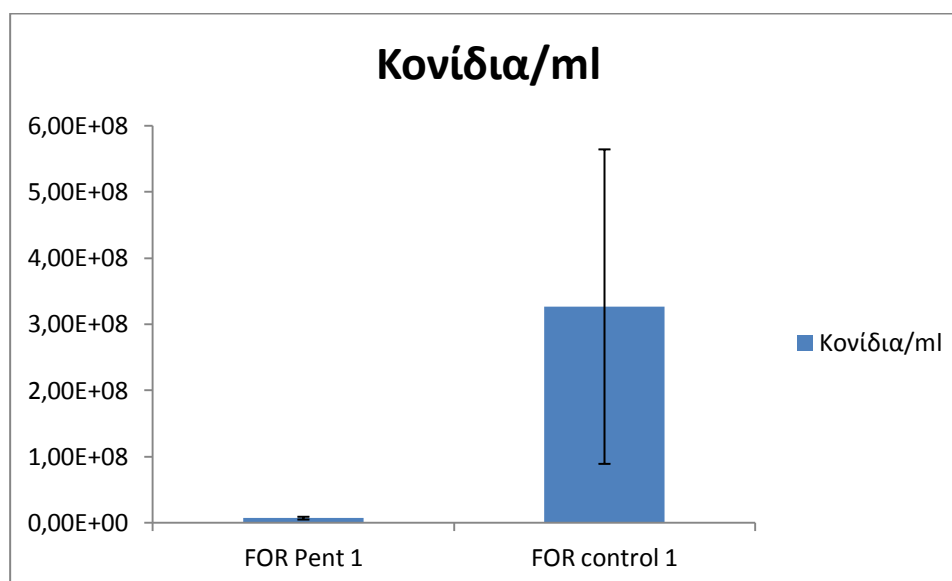
1)



2)



3)

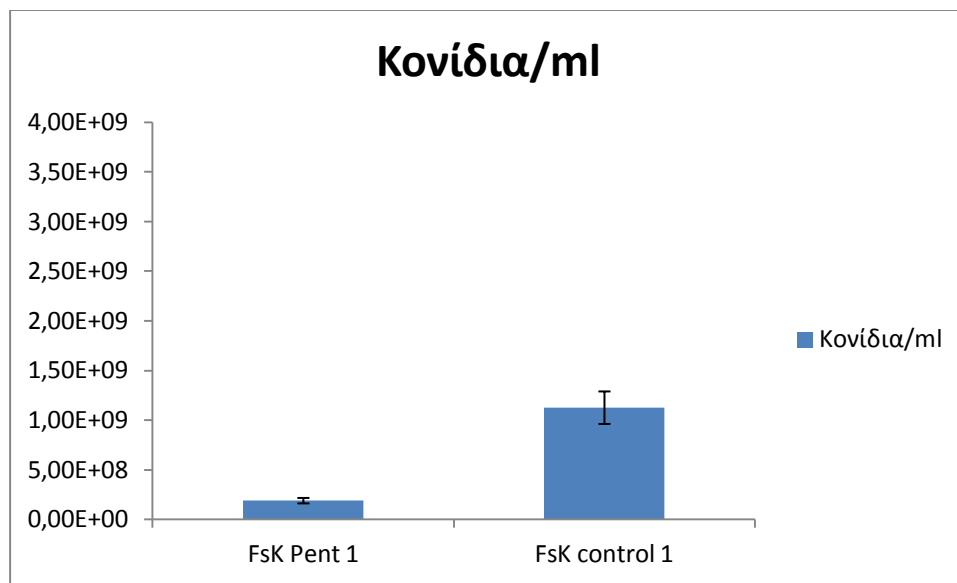


Οι μπάρες απεικονίζουν τα ποσοστά των κονιδίων των μυκήτων 1) Fsk, 2) FORL και 3)FOR APO ACE παρουσία και απουσία μερικών κυττάρων *P. entomophila* σε εκθετική φάση. Επίσης παρουσιάζεται ο μέσος όρος των μετρήσεων και η τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων

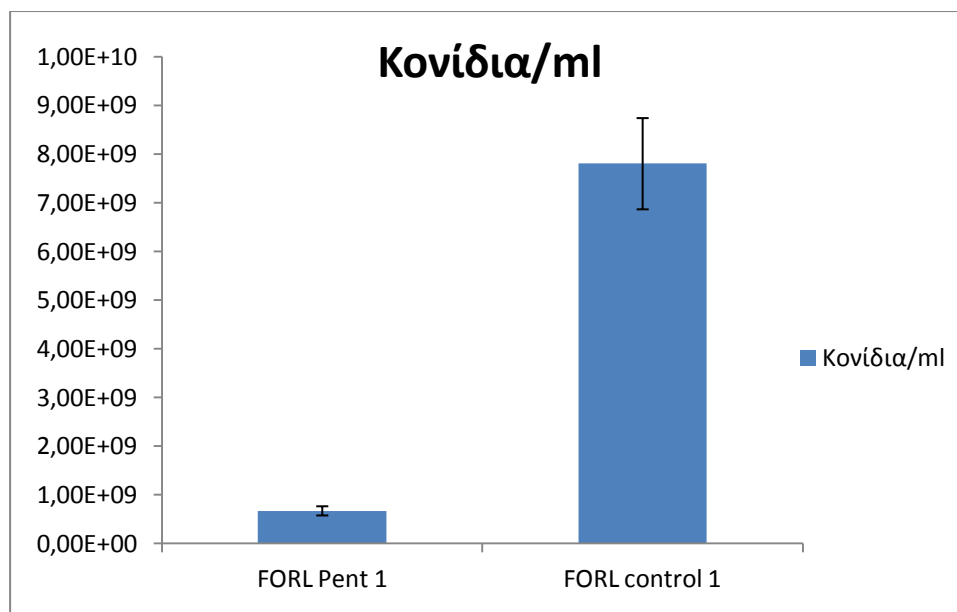
## 2<sup>η</sup> Επέμβαση:

Και στην περίπτωση αυτή οι υγρές καλλιέργειες από κάθε μύκητα αναπτύσσονται σε θρεπτικό PDB ενώ το υπερκείμενο, στο οποίο είναι παρόντα μερικά κύτταρα του βακτηρίου, προέρχεται από καλλιέργεια *P. entomophila* στατικής φάσης σε King's B. Μετά την απομόνωση των κονιδίων ακολουθεί ο προσδιορισμός τους με τη χρήση της αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer. Η μέτρηση των κονιδίων των μυκήτων χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία του διαγράμματος, στο οποίο εμφανίζονται τα μειωμένα ποσοστά σε σύγκριση με τα control. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν αναστολή στην αναπαραγωγική ικανότητα των μυκήτων παρουσία μερικών κυττάρων του βακτηρίου σε στατική φάση και είναι ανάλογη της αναστολής που παρατηρήθηκε παρουσία κυττάρων *P. entomophila* σε εκθετική φάση.

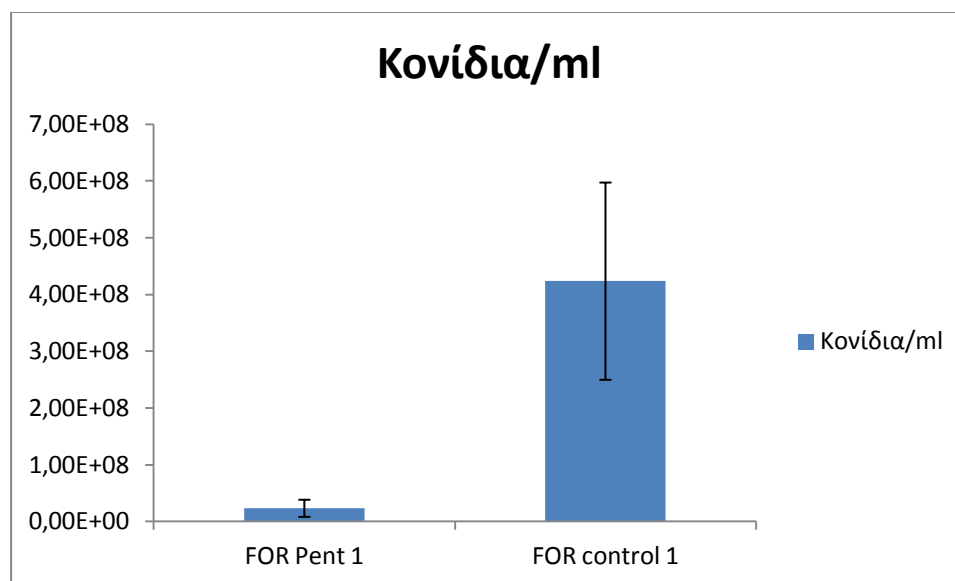
1)



2)



3)

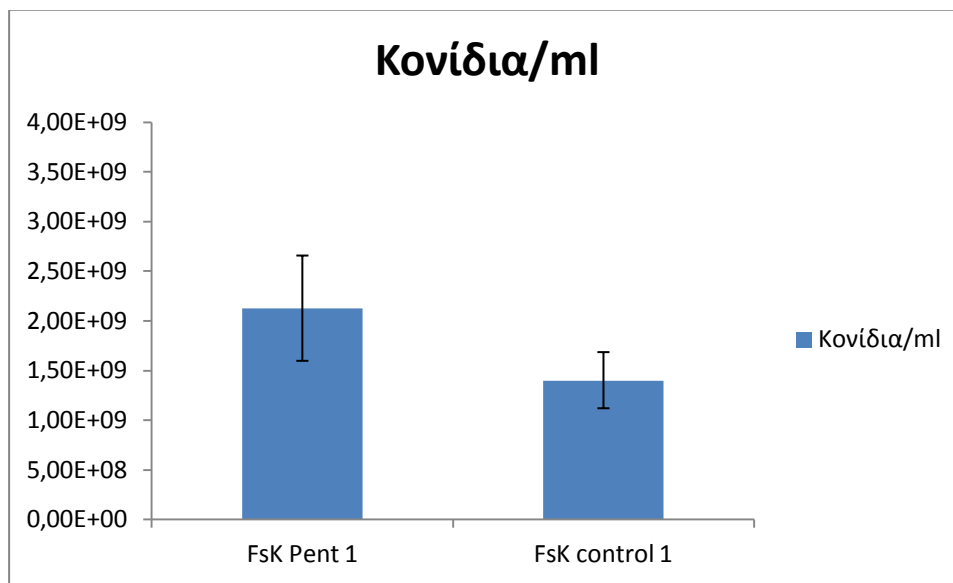


Οι μπάρες απεικονίζουν τα ποσοστά των κονιδίων των τριών μυκήτων 1) Fsk, 2) FORL και 3)FOR παρουσία και απουσία μερικών κυττάρων *P. entomophila* σε στατική φάση. Επίσης παρουσιάζεται ο μέσος όρος των μετρήσεων και η τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων.

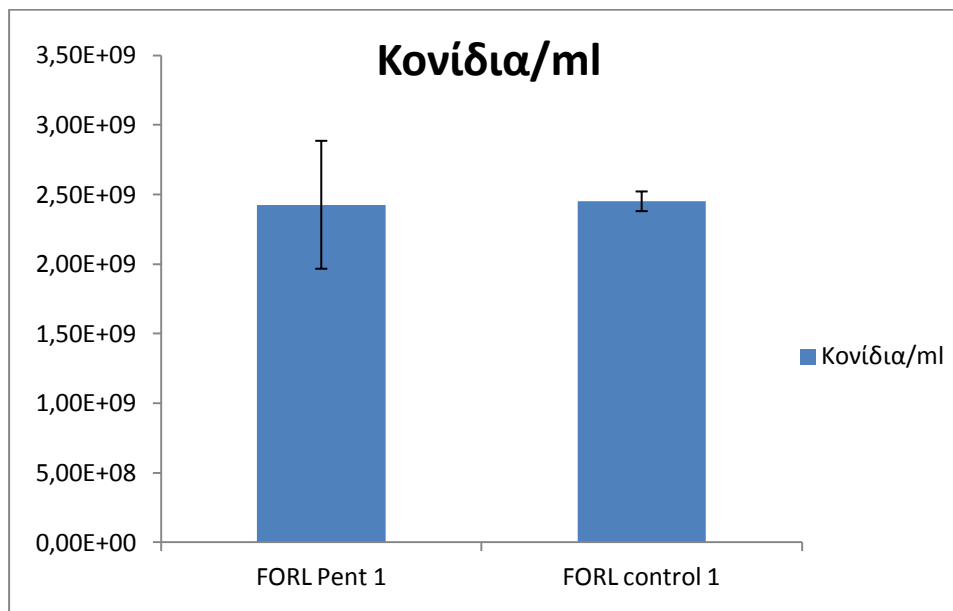
### 3<sup>η</sup> Επέμβαση

Κωνικές φιάλες με υγρό θρεπτικό υπόστρωμα PDB στο οποίο αναπτύσσεται τμήμα στερεής καλλιέργειας από κάθε μύκητα εμβολιάστηκαν με φιλτραρισμένο υπερκείμενο που προέρχεται από καλλιέργεια *P. entomophila* εκθετικής φάσης σε King's B. Η μέτρηση των κονιδίων των μυκήτων χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία του διαγράμματος, στο οποίο εμφανίζονται παρόμοια ποσοστά σε σύγκριση με τα control στην περίπτωση που γίνεται εμβολιασμός μόνο υπερκειμένου στην υγρή καλλιέργεια του μύκητα. Το αποτέλεσμα αυτό αποδεικνύει πως απουσία κυττάρων δεν παρατηρείται αναστολή στην αναπαραγωγική ικανότητα των μυκήτων.

1)

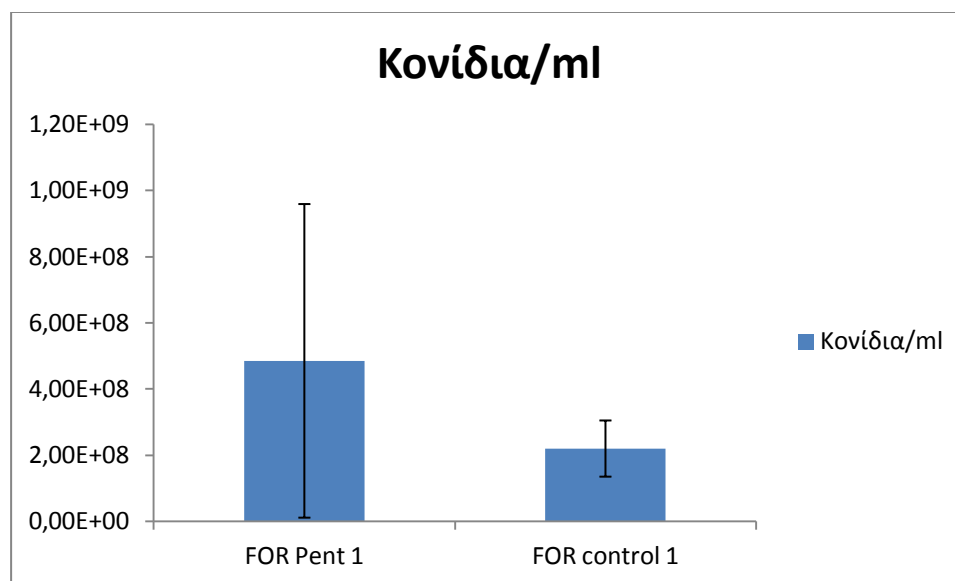


2)





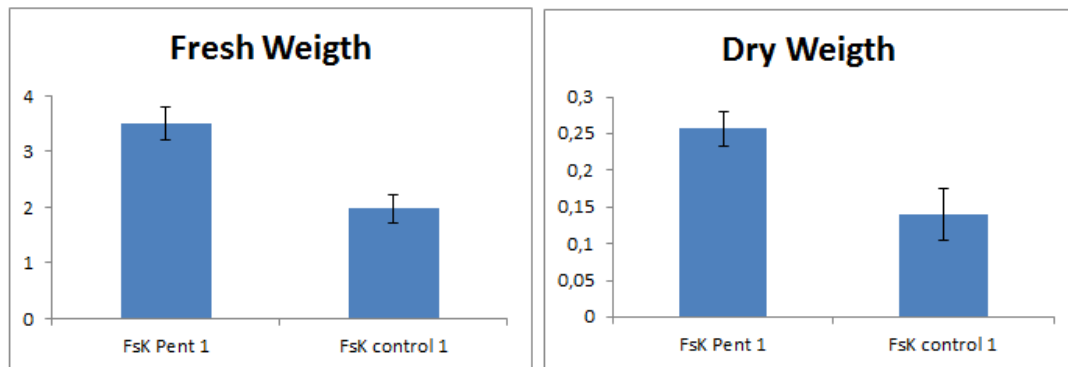
3)



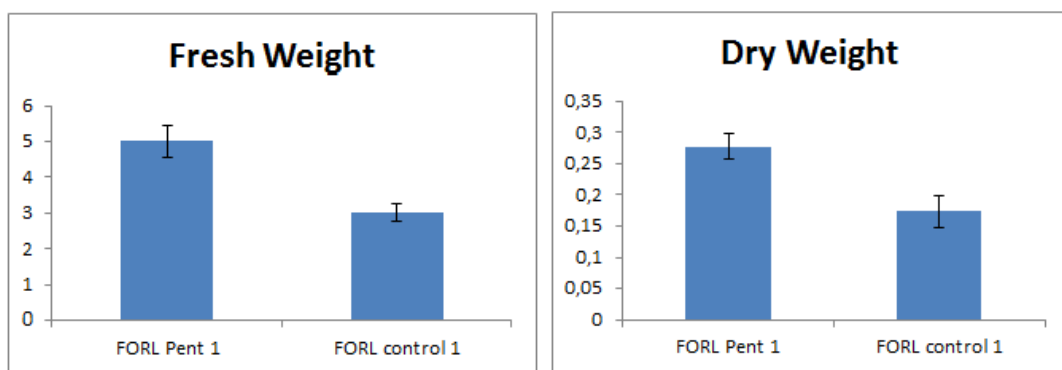
Οι μπάρες απεικονίζουν τα ποσοστά των κονιδίων των τριών μυκήτων 1) Fsk, 2) FORL και 3)FOR APO ACE παρουσία υπερκειμένου της *P. entomophila*, που προέρχεται από εκθετική φάση. Επίσης παρουσιάζεται ο μέσος όρος των μετρήσεων και η τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων.

Μετά τη μέτρηση των κονιδίων, ακολουθεί ο προσδιορισμός της βιομάζας του μύκητα, όπου εμφανίζεται αυξημένο ποσοστό ανάπτυξης κατά την παρουσία υπερκειμένου της *P. entomophila* σε σύγκριση με τα control. Στο υπερκείμενο της καλλιέργειας Pe σε King's παράγονται κάποιες ενώσεις που μπορεί να είναι ακόμα και πρωτεϊνικής φύσεως και μπορούν να επάγουν την ανάπτυξη των μυκηλιακών υφών των μυκήτων, χωρίς όμως να υπάρχει κάποια επίδραση των ουσιών αυτών στην παραγωγή των κονιδίων.

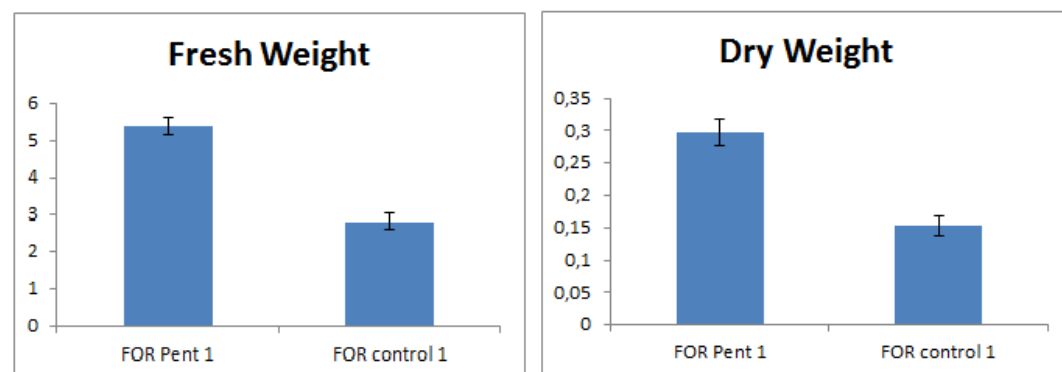
1)



2)



3)

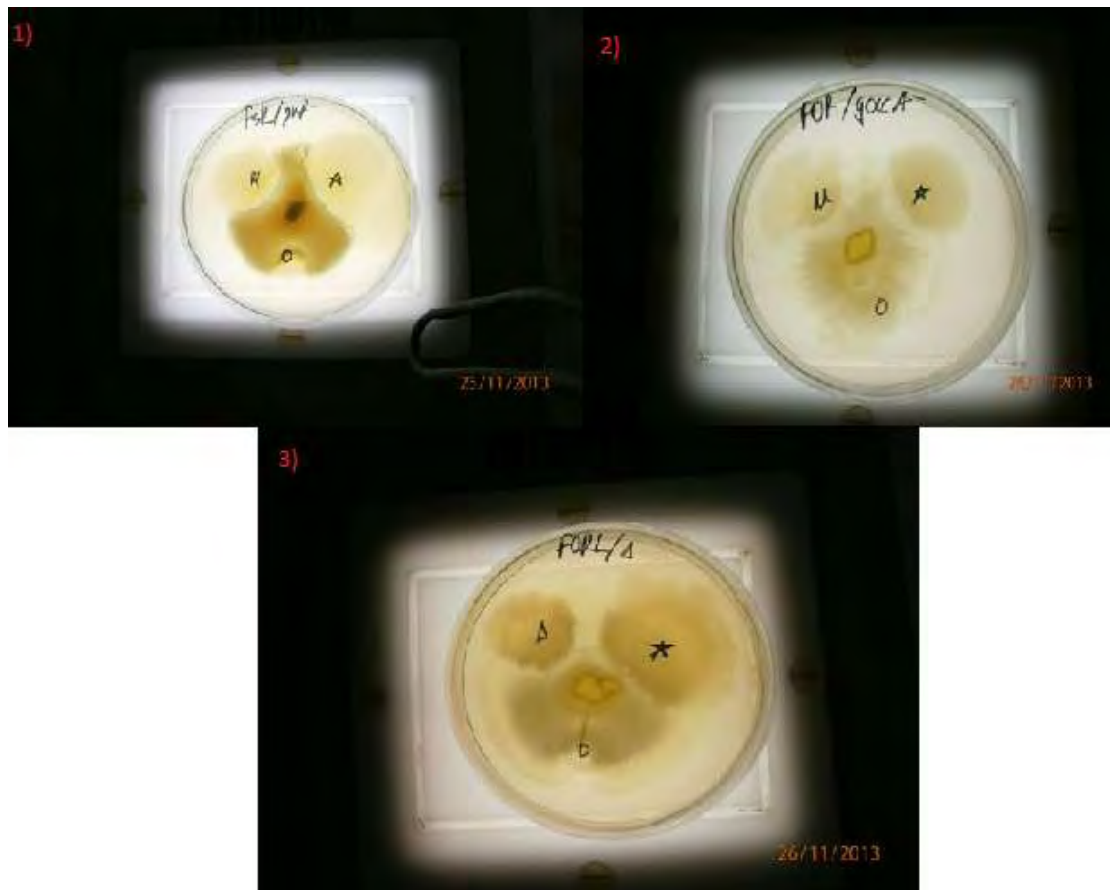


Οι μπάρες απεικονίζουν τη μάζα των τριών μυκήτων 1) Fsk, 2) FORL και 3)FOR παρουσία υπερκειμενου της *P. entomophila* σε εκθετική φάση. Επίσης παρουσιάζεται ο μέσος όρος των μετρήσεων και η τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων.

### 3.7 ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΑ

Η *P.entomophila* έχει την ικανότητα να παράγει δευτερογενείς μεταβολίτες. Είναι γνωστό πως η παραγωγή τους ρυθμίζεται από το σύστημα GacS/GacA και από τα γονίδια *pnf*. Για να μελετηθεί ο ρόλος των δευτερογενών μεταβολιτών χρησιμοποιήθηκαν τα μεταλλάγματα *pnf<sup>-</sup>*, *gac A<sup>-</sup>*, *gac A<sup>-</sup>/pnf<sup>-</sup>*, στα οποία μπλοκάρεται η παραγωγή των μεταβολιτών. Αρχικά δοκιμάστηκε η ανάπτυξη των μεταλλαγμάτων σε θρεπτικό υλικό με και χωρίς αντιβιοτικό. Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας παρατηρήθηκαν τα εξής:

Το μετάλλαγμα *pnf<sup>-</sup>* αναπτύσσεται σε τρυβλίο με King' s B με αντιβιοτικό γενταμυκίνη ενώ τα μεταλλάγματα *gac A<sup>-</sup>*, *gac A<sup>-</sup>/pnf<sup>-</sup>* σε τρυβλία King' s B χωρίς αντιβιοτικό. Με βάση τα παραπάνω ελέγχθηκε η ανταγωνιστική δράση των μεταλλαγμάτων της *P. entomophila* στους μύκητες FORL, FOR και Fsk σε τρυβλία King's B. Παρατηρήθηκε πως και στα τρία μεταλλάγματα οι υφές του μύκητα αρχικά προσεγγίζουν τις καλλιέργειες του μεταλλάγματος και του αγρίου τύπου ενώ στη συνέχεια καταλαμβάνουν το μέρος του χώρου γύρω από την καλλιέργεια. Ο μύκητας εφάπτεται στις καλλιέργειες ενώ αντίθετα διαπερνά και αναπτύσσεται πάνω από την καλλιέργεια της *E. coli* που αποτελεί το αρνητικό control. Η μερική αυτή αναστολή παρατηρείται και στους τρεις μύκητες.



- 1) Φωτογραφία του μύκητα Fsk παρουσία καλλιεργείων  $\Delta prf$  (M) και *P. entomophila* (\*) σε θρεπτικό King's B. Οι υφές δεν διέρχονται από τις καλλιέργειες *P. entomophila* και  $\Delta prf$  (M).
- 2) Φωτογραφία του μύκητα FOR παρουσία καλλιεργείων  $\Delta gacA$  (M) και *P. entomophila* (\*) σε θρεπτικό King's B. Οι υφές δεν διέρχονται από τις καλλιέργειες *P. entomophila* και  $\Delta gacA$ .
- 3) Φωτογραφία του μύκητα FORL παρουσία καλλιεργείων  $\Delta gacA/prf$  ( $\Delta$ ) και *P. entomophila* (\*) σε θρεπτικό King's B. Οι υφές δεν διέρχονται από τις καλλιέργειες *P. entomophila* και  $\Delta gacA/prf$  ( $\Delta$ ).

### 3.8 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ *P. ENTOMOPHILA* ΚΑΙ ΤΗΣ *P. AERUGINOSA* ΣΤΟΥΣ ΜΥΚΗΤΕΣ FORL, FOR ΚΑΙ FSK

Συμπερασματικά, μπορεί να ειπωθεί πως οι δευτερογενείς μεταβολίτες και οι πιθανοί παράγοντες ανταγωνισμού της *P. entomophila* επηρεάζουν την ανάπτυξη των μυκήτων προκαλώντας αύξηση της βιομάζας τους. Κάτι τέτοιο γίνεται κατανοητό βάσει των πειραμάτων με τα υπερκείμενα. Αντίθετα η παρουσία κυττάρων είναι δυνατό να επιφέρει αναστολή στην ανάπτυξη του μύκητα σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου σε τρυβλίο και στην αναπαραγωγική ικανότητα των μυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία σε υγρές καλλιέργειες. Το ερώτημα που πρέπει να απαντηθεί είναι εάν η αναστολή που διερευνάται, οφείλεται σε κάποιον πιθανό παράγοντα ανταγωνισμού της *Pseudomonas entomophila* ή οφείλεται σε κάποιον παράγοντα που είναι κοινός στο γένος *Pseudomonas*. Γι' αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκε επανάληψη κάποιων πειραμάτων χρησιμοποιώντας αυτή τη φορά το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa*. Ομοίως με την *P. entomophila*, σε τρυβλία King's B οι υφές των μυκήτων προσεγγίζουν την καλλιέργεια της *P. aeruginosa* όμως δεν μπορούν να διέλθουν από αυτήν. Αντίθετα η καλλιέργεια της *E.coli* καλύπτεται από τις υφές των μυκήτων.

1)



2)



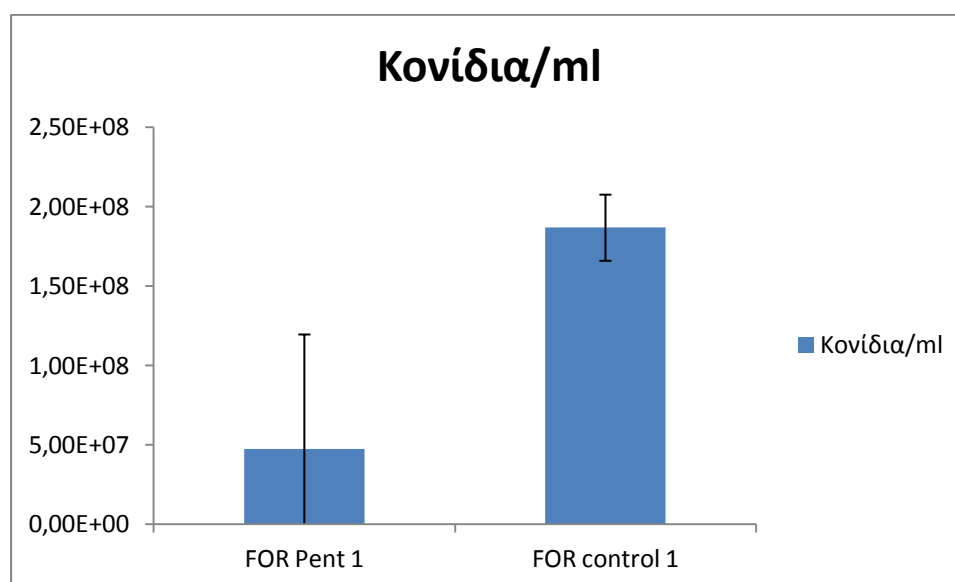
3)



Φωτογραφίες των μυκήτων 1) Fsk 2) FORL και 3) FOR σε θρεπτικό King's B παρουσία καλλιέργειών *P. entomophila* (\*) *P. aeruginosa* (✓) σε στατική φάση. Οι υφές δεν διέρχονται από τις καλλιέργειες *P. entomophila* και *P. aeruginosa*.

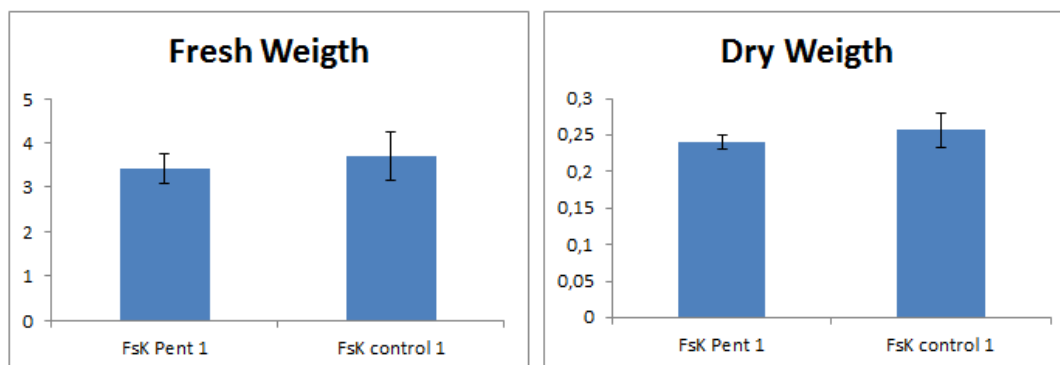
### 3.9 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ FSK ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟΥ ΤΗΣ *P. AERUGINOSA*

Υγρές καλλιέργειες Fsk σε θρεπτικό υπόστρωμα PDB εμβολιάζονται με φιλτραρισμένο υπερκείμενο που προέρχεται από καλλιέργεια *P. aeruginosa* εκθετικής φάσης σε King's B. Κατά τον προσδιορισμό των κονιδίων εμφανίζονται παρόμοια ποσοστά ανάμεσα στον Fsk παρουσία υπερκειμένου της *P. aeruginosa* στην καλλιέργειά του και στον Fsk απουσία υπερκειμένου.



Οι μπάρες απεικονίζουν τα ποσοστά των κονιδίων του μύκητα Fsk, παρουσία υπερκειμένου της *P. aeruginosa*. Επίσης παρουσιάζεται ο μέσος όρος των μετρήσεων και η τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων.

Επιπρόσθετα, κατά τον προσδιορισμό της βιομάζας του μύκητα, εμφανίζεται παρόμοιο ποσοστό ανάπτυξης κατά την παρουσία υπερκειμένου της *P. aeruginosa* σε σύγκριση με τα control. Κάτι τέτοιο έρχεται σε αντίθεση με το υπερκείμενο της *P. entomophila* όπου είχε παρατηρηθεί αύξηση της βιομάζας σε σύγκριση με τα control.



Οι μπάρες απεικονίζουν τη βιομάζα του μύκητα Fsk, παρουσία υπερκειμένου της *P. aeruginosa*. Επίσης παρουσιάζεται ο μέσος όρος των μετρήσεων και η τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων.

Ανακεφαλαιώνοντας, από τις δοκιμές ανάπτυξης των μικροοργανισμών στα διάφορα υποστρώματα, διαπιστώθηκε πως τα κοινά θρεπτικά υλικά ανάπτυξης είναι το LB και το King's B. Η *P. entomophila* δεν αναπτύσσεται στα θρεπτικά υλικά των μυκήτων, δηλαδή στο PDA και Malt Extract. Κατά τον έλεγχο της ανταγωνιστικής δράσης της *P. entomophila* και μυκήτων σε τρυβλία με LB ανεξάρτητα από το εάν το βακτήριο βρισκόταν σε εκθετική ή σε στατική φάση και ανεξάρτητα από το εάν η τοποθέτηση στο ίδιο τρυβλίο έγινε ταυτόχρονα ή με διαφορά ώρας οι υφές των μυκήτων διαπερνούν τις αποικίες του βακτηρίου και συνεπώς δεν παρατηρήθηκε κάποια αναστολή. Αντίθετα κατά την έλεγχο σε τρυβλία King's B, ο μύκητας εφάπτεται στην καλλιέργεια και παρατηρείται μερική αναστολή. Κατά την εξέταση της ανάπτυξης των μυκήτων σε King's B παρουσία υπερκειμένου του βακτηρίου από δύο φάσεις ανάπτυξης δεν υπήρξε διαφοροποίηση στην ανάπτυξη των μυκήτων σε σχέση με τα control στην πορεία του χρόνου. Από την μελέτη της αναστολής των κονιδίων των μυκήτων που αναπτύσσονται σε θρεπτικό PDB παρουσία υπερκειμένου της *P. entomophila*, η οποία αναπτύχθηκε σε θρεπτικό King's B στο οποίο είναι παρόντα μερικά κύτταρα του βακτηρίου παρατηρούνται μειωμένα ποσοστά κονιδίων. Αντίθετα παρουσία φιλτραρισμένου υπερκειμένου χωρίς κύτταρα του βακτηρίου εμφανίζονται παρόμοια ποσοστά σε σύγκριση με τα control όσον αφορά τα κονίδια ενώ τα ποσοστά της βιομάζας είναι αυξημένα σε σύγκριση με τα control. Επιπλέον ελέγχθηκε η ανταγωνιστική δράση των μεταλλάξεων της *P. entomophila* έναντι των μυκήτων FORL, FOR και Fsk σε τρυβλία King's B. Παρατηρήθηκε πως και στα τρία μεταλλάγματα οι μύκητες εφάπτονται στις



καλλιέργειες αλλά δεν τις διαπερνούν. Κατά τη διερεύνηση της αναστολής των μυκήτων από την *P. aeruginosa* σε τρυβλία προκύπτουν τα ίδια αποτελέσματα με την *P. entomophila*, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι μερική αναστολή στην διαμετρική αύξηση των μυκήτων παρατηρείται παρουσία κυττάρων. Κατά τον προσδιορισμό των κονιδίων του μύκητα Fsk παρουσία υπερκειμένου από καλλιέργεια *P. aeruginosa* εμφανίστηκαν παρόμοια ποσοστά σε σύγκριση με τα control και κατά τον προσδιορισμό της βιομάζας παρατηρείται μικρή διαφορά στην ανάπτυξη των μυκήτων.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η *P. entomophila* είναι το μόνο βακτηριακό στέλεχος του γένους *Pseudomonas*, που είναι αποδεδειγμένο ότι μολύνει με φυσικό τρόπο την *Drosophila melanogaster*, επάγει συστηματική ανοσολογική απόκριση στο πεπτικό σύστημα της και μπορεί να την οδηγήσει σε θάνατο. Υψηλή παθογένεια εμφανίζεται τόσο σε προνύμφες *Drosophila* όσο και σε ενήλικα άτομα. (Vodovar et al., 2005). Η πλήρης αλληλουχία του γονιδιώματος της *P. entomophila* προσέφερε μια εικόνα σχετικά με τον τρόπο ζωής του εντομοπαθογόνου αυτού οργανισμού και αποκάλυψε πιθανούς παράγοντες μολυσματικότητας μαζί με ρυθμιστές που ρυθμίζουν την έκφραση τους. Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό να μελετηθεί εάν το συγκεκριμένο βακτήριο εκτός από εντομοπαθογόνες ιδιότητες, έχει την ικανότητα να παρεμποδίζει την ανάπτυξη φυτοπαθογόνων μυκήτων.

Από την βιβλιογραφία γνωρίζουμε πως το είδος *P. fluorescens* έχει την ικανότητα να παράγει δευτερογενείς μεταβολίτες και με τον τρόπο αυτό έχει βρεθεί πως επηρεάζει την ανάπτυξη κάποιων πρωτόζωων. Τα πρωτόζωα είναι ευκαρυωτικοί οργανισμοί και μπορούν να επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό την ανάπτυξη βακτηρίων όταν βρεθούν στο ίδιο ενδιαίτημα. Τα βακτήρια προκειμένου να ανταγωνιστούν τα πρωτόζωα παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες. Ένας από τους δευτερογενείς μεταβολίτες που συμμετέχει στην αναστολή της ανάπτυξης κάποιων πρωτόζωων είναι το υδροκυάνιο (Valverde et al., 2006). Έχει αποδειχθεί επιπλέον πως η *P. fluorescens* έχει την ικανότητα να προστατεύει φυτά από παθογόνους μύκητες. Κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του βακτηρίου στη ρίζα φυτών, αυτό έχει την ικανότητα να παράγει αντιβιοτικά εναντίον των μυκήτων και να προκαλεί επαγόμενη συστηματική αντοχή στο φυτό, προστατεύοντας το από νοσήματα που οφείλονται σε φυτοπαθογόνους μύκητες (Haas and Defago 2005).

Με βάση τα παραπάνω δημιουργήθηκε το ερώτημα εάν οι πιθανοί παράγοντες εντομοπαθογένειας της *P. entomophila* ήταν ικανοί να μετριάσουν την ανάπτυξη φυτοπαθογόνων μυκήτων στο περιβάλλον τους. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα ελέγχου της ανταγωνιστικής δράσης της *P. entomophila* στους μύκητες FORL, FOR και Fsk σε τρυβλία με διάφορα θρεπτικά υποστρώματα. Δυστυχώς, η *P. entomophila* δεν μπόρεσε να αναπτυχθεί στα θρεπτικά

υποστρώματα Malt Extract και PDA των μυκήτων όπως ήταν η αρχική σκέψη. Ύστερα από αρκετές δοκιμές *in vitro*, διαπιστώθηκε πως ανεξάρτητα από τη φάση ανάπτυξης του βακτηρίου αυτό είναι ικανό να παρεμποδίζει μερικώς την ανάπτυξη των υφών των τριών μυκήτων που εξετάστηκαν σε τρυβλία King's B. Επιπρόσθετα, ανεξάρτητα από το εάν το υπερκείμενο, που χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό των υγρών καλλιεργειών των μυκήτων, προέρχεται από καλλιέργεια εκθετικής ή στατικής φάσης, στο οποίο είναι παρόντα κυττάρων της *P. entomophila*, παρατηρήθηκε μείωση στον αριθμό των κονιδίων σε σχέση με τα control. Τα αποτελέσματα αυτά είναι παρατηρήσεις που προέρχονται από πείραμα το οποίο σχεδιάστηκε για να πραγματοποιηθεί με υπερκείμενο. Στην περίπτωση όμως αυτή δεν έγινε επιτυχημένη απομάκρυνση κυττάρων λόγω πειραματικού σφάλματος. Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητό πως η παρουσία κυττάρων *P. entomophila* μπορεί να επιφέρει αναστολή στην ανάπτυξη των μυκήτων FORL, FOR και Fsk.

Είναι ευρέως αποδεκτό πως η μολυσματικότητα της *P. entomophila* όσον αφορά τα έντομα είναι πολυπαραγοντική. Δε γνωρίζουμε όμως ακόμα σε ποιο βαθμό και σε τι ποσοστό συμμετέχει ο κάθε παράγοντας τοξικότητας. Έτσι είναι πιθανό όταν «αφαιρούμε» έναν από τους παράγοντες, οι υπόλοιποι παράγοντες να είναι αρκετοί για να προκαλέσουν τον ίδιο βαθμό παθογένειας, όπως και ο άγριος τύπος. Γι' αυτό το λόγο εξετάστηκαν τα μεταλλάγματα *ΔgacA*, *Δpnf*, *ΔgacA/pnf*. Το σύστημα GacS/GacA ρυθμίζει την έκφραση παραγόντων παθογένειας και τα γονίδια *pnf* παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια. Θα περιμέναμε, λοιπόν, τα μεταλλάγματα να παρουσιάζουν μειωμένη ή και καθόλου παθογένεια. Έτσι, εξετάστηκε η αναστολή των μεταλλαγμάτων της *P. entomophila* στους μύκητες FORL, FOR και Fsk σε τρυβλία King's B. Το αποτέλεσμα ήταν όμοιο με αυτό του αγρίου τύπου. Η παρουσία και μόνο των κυττάρων ήταν ικανή να περιορίσει την ανάπτυξη των μυκήτων γύρω από την καλλιέργεια των μεταλλαγμάτων. Είναι πιθανό οι δευτερογενείς μεταβολίτες όπως υδροκυάνιο, σιδηροφόρα που μπλοκάρονται από το σύστημα GacS/GacA να μην είναι αυτοί οι παράγοντες που ευθύνονται για τη μερική αναστολή της ανάπτυξης των μυκήτων. Καλό θα ήταν να μελετηθεί η επίδραση του υπερκειμένου των μεταλλαγμάτων στην παραγωγή των κονιδίων και στη βιομάζα των μυκήτων.

Επιπρόσθετα, κατά τη διεξαγωγή *in vitro* πειράματων σε τρυβλία King's B με υπερκείμενο της *P. Entomophila* και από τις δύο φάσεις ανάπτυξης του βακτηρίου,

δεν εμφανίστηκε αναστολή στην ανάπτυξη των μυκήτων καθ' όλη την πορεία του χρόνου. Από τα πειράματα με τα φιλτραρισμένα υπερκείμενα του άγριου τύπου συμπεραίνεται πως οι δευτερογενείς μεταβολίτες και γενικότερα οι πιθανοί παράγοντες ανταγωνισμού που αναφέρθηκαν δεν επηρεάζουν την παραγωγή των κονιδίων των τριών μυκήτων που εξετάστηκαν. Όμως στο υπερκείμενο της καλλιέργειας Pe σε King's παράγονται ενώσεις που επάγουν την ανάπτυξη των μυκηλιακών υφών των μυκήτων. Μόνο η παρουσία των κυττάρων της *P. entomophila* είναι ικανή να προκαλέσει αναστολή. Από την παρατήρηση των τρυβλίων στις οποίες οι υφές των μυκήτων εφάπτονται στις καλλιέργειες του βακτηρίου και δεν διέρχονται από αυτές, θα μπορούσε να ειπωθεί πως κάποιος παράγοντας ο οποίος βρίσκεται στην επιφάνεια των κυττάρων της *P. entomophila* ευθύνεται για την αναστολή. Προκειμένου να εξακριβωθεί εάν ο παράγοντας αυτός βρίσκεται μόνο στην επιφάνεια του βακτηρίου *P. entomophila* ή βρίσκεται γενικά στην επιφάνεια του γένους *Pseudomonas* πραγματοποιήθηκαν ανάλογα πειράματα και με την *P. aeruginosa*. Η παρουσία κυττάρων *P. aeruginosa* επιφέρει αναστολή στην ανάπτυξη των υφών του μύκητα. Το υπερκείμενο δεν επηρεάζει την αναπαραγωγική τους ικανότητα, όμως δεν εμφανίζεται αύξηση στη βλαστητική ανάπτυξη όπως παρατηρήθηκε κατά τη διεξαγωγή του ίδιου πειράματος με την *P. entomophila*. Μπορεί να ειπωθεί πως τα δυο βακτήρια λειτουργούν με διαφορετικό τρόπο έναντι των μυκήτων διότι είναι διαφορετικές οι ενώσεις που εκκρίνουν.

Γενικά, μετά το πέρας των πειραμάτων μπορεί να αναφερθεί ότι η παρουσία κυττάρων *P. entomophila* παρεμποδίζει ανάπτυξη των μυκήτων FORL, FOR και Fsk και επιπλέον περιορίζει την αναπαραγωγική ικανότητα τους μειώνοντας τον αριθμό των κονιδίων.. Δεν φαίνεται να υπάρχουν δευτερογενείς μεταβολίτες, που παράγονται κατά τη μετάβαση από την εκθετική φάση στη φάση στασιμότητας, οι οποίοι να είναι αρκετοί να προκαλέσουν αναστολή στην ανάπτυξη των μυκήτων που εξετάστηκαν. Με βάση την παρατήρηση ότι το υπερκείμενο της Pent οδηγεί σε προαγωγή της ανάπτυξης των μυκήτων, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί όχι πλέον ως ανταγωνιστής των παθογόνων αλλά συνεργιστικά με ανταγωνιστές παθογόνων για την προαγωγή της φυτοπροστατευτικής τους δράσης. Επομένως φαίνεται ότι εκκρίνονται ενώσεις που μπορεί να είναι δευτερογενείς μεταβολίτες ή ακόμα και ενώσεις πρωτεϊνικής φύσεως οι οποίοι επηρεάζουν την ανάπτυξη των μυκήτων που εξετάστηκαν. Όμως, για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων θα ήταν θεμιτό να εξεταστεί η δράση του

βακτηρίου σε περισσότερους φυτοπαθογόνους μύκητες ή ακόμη να μελετηθεί η αλληλεπίδραση της *P. entomophila* με φυτοπαθογόνα βακτήρια. Τέλος αξίζει να εξεταστεί περαιτέρω το υπερκείμενο του βακτηρίου προκειμένου να διαπιστωθούν οι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μυκήτων.

## 5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Ξένη βιβλιογραφία

- Askeland R. and Morrison S., 1983, Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa*. Applied and Environmental Microbiology
- Blancard D., 1994. «A color Atlas of Tomato Diseases Observation, Identification and Control». Manson Publishing, France
- Blumer C, Heeb S, Pessi G, Haas D.(1999) Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific ribosome binding sites. PNAS
- Blumer C. and Dieter Haas, 2000, Mechanism, regulation and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. Arch. Microbiology
- Bode HB, 2009. Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. Curr Opin Chem Biology
- Broderick KE, Chan A, Balasubramanian M, Feala J, Reed SL, Panda M, Sharma VS, Pilz RB, Bigby TD, Boss GR, 2008, Cyanide produced by human isolates of *Pseudomonas aeruginosa* contributes to lethality in *Drosophila melanogaster*, Journal of Infectious Diseases
- Castric P. A, 1977. Glycine metabolism by *Pseudomonas aeruginosa*: hydrogen cyanide biosynthesis. Journal of Biotechnology
- Castric P. A., Ebert R.F., Castric K.F, 1979. The relationship between growth phase and cyanogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Curr. Microbiology
- Crickmore N. Beyond the spore--past and future developments of *Bacillus thuringiensis* as a biopesticide, 2006.
- Devi KK and Kothamasi D, 2009. *Pseudomonas fluorescens* CHA0 can kill subterranean termite *Odontotermes obesus* by inhibiting cytochrome c oxidase of the termite respiratory chain. FEMS Microbiology Letters
- Fedhila S., Buisson C., Dussurget O., Serror P., Glomski I.J., Liehl P., Lereclus D., Nielsen-LeRoux C, 2009 Comparative analysis of the virulence of invertebrate and mammalian pathogenic bacteria in the oral insect infection model *Galleria mellonella*, Journal of Invertebrate Pathology.

- Gallagher L. and Manoil C., 2001, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning. Journal of Bacteriology
- Gordon, T. R. & Martyn, R. D. 1997. Η εξελικτική ιστορία του *Fusarium oxysporum*. Phytopathology.
- Haas D, Défago G, Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads, 2005.
- Knowles CJ, Bunch AW, 1986. Microbial cyanide metabolism. Adv. Microb. Physiology.
- Karvoulakis N., Ehaliotis C., Ntougias S., Zervakis Gl., Papadopoulou K., 2005, Local and systemic resistance against fungal pathogens of tomato plant elicited by a compost deriving from agricultural residues, Physiology and Molecular Plant Pathology.
- Lapouge K., Schubert M., Frederic HT., Haas DA., 2008. Gac/Rsm signal transduction pathway of  $\gamma$ -proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behavior. Molecular Microbiology
- Laville J, Blumer C, Von Schroetter C, Gaia V, Défago G, Keel C, Haas D, 1998. Characterization of the *hcnABC* gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Journal of Bacteriology
- Liane Rosewich U., R.E. Pettway, Talma Katan, and H.C. Kistler, 1999. «Population Genetic Analysis Corroborates Dispersal of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicalislycopersici* from Florida to Europe». Plant Pathology Department.
- Liehl P., Blight M., Vodovar N., Boccard F., Lemaitre B., 2006, Prevalence of local immune response against oral infection in a *Drosophila/Pseudomonas* infection model. PLoS Pathogens
- Mulet M, Gomilac M, Lemaitre B, Lalucata J, Garca-Valdís El., 2012 Taxonomic characterisation of *Pseudomonas* strain L48 and formal proposal of *Pseudomonas entomophila* sp. Systematic and Applied Microbiology
- Opota O, Vallet-Gély I, Vincentelli R, Kellenberger C, Iacovache I, Gonzalez MR, Roussel A, Goot FG, Lemaitre B, Monalysin, a novel  $\beta$ -pore-forming toxin from the *Drosophila* pathogen *Pseudomonas entomophila*, contributes to host intestinal damage and lethality, 2011

- Pessi G. and Haas D., 2000, Transcriptional control of the hydrogen cyanide biosynthetic genes hcnABC by the anaerobic regulator ANR and the quorum-sensing regulators LasR and RhlR in *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Bacteriology
- Reimmann C, Beyeler M, Latifi A, Winteler H, Foglino M, Lazdunski A, Haas D, The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase, 1997.
- Ryall B., Mitchell H., Mossialos D., Williams H.D, 2009, Cyanogenesis by the entomopathogenic bacterium *Pseudomonas entomophila*, Letters in Applied Microbiology
- Vallet-Gely Is., Onya Opota On., Boniface Aud, Novikov Al., Lemaitre B A, 2008, Secondary metabolite acting as a signalling molecule controls *Pseudomonas entomophila* virulence, Cellular Microbiology
- Valverde C., Heeb S., Keel C., Haas D., RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in *Pseudomonas fluorescens* CHA0, 2003, Molecular Microbiology.
- Vodovar N., Vallenet D., Cruveiller S., Rouy Z., Barbe V., Acosta C., Cattolico L., Jubin C., Lajus A., Segurens B., Vacherie B., Wincker P., Weissenbach J., Lemaitre B., Medigue C., Boccard F., 2006, Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. Nature Biotechnology
- Vodovar N., Vinals M., Liehl P., Basset A., Degrouard J., Spellman P., Boccard F., Lemaitre B., 2005, *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. PNAS
- Waterfield N, Gerrard J, Vohra R, French-Constant R, Human infection with *Photobacterium* *asymbiotica*: an emerging bacterial pathogen, 2004
- Zhang S., Roberts P. D., McGovern R. J., and Datnoff L. E., 2011. «Fusarium Crown and Root Rot of Tomato in Florida», university of Florida.
- Zimmermann A, Reimmann C, Galimand M, Haas D, Anaerobic growth and cyanide synthesis of *Pseudomonas aeruginosa* depend on anr, a regulatory gene homologous with fnr of *Escherichia coli*, 1991



- Zlosnik JE and Williams HD, 2004. Methods for assaying cyanide in bacterial culture supernatant. Letters in Applied Microbiology

### **Ελληνική βιβλιογραφία**

- Δημόπουλος Β., 2010. «Φυτοπροστατευτικά προϊόντα τρόποι δράσης και εφαρμογές στην Ελλάδα», εκδόσεις Έμβρυο. Αθήνα 2010.
- Βακαλουνάκης Δ. Ι., Φραγκιαδάκης Γ. 1998. Φουζαρίωση της αγγουριάς (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*). Νέα δεδομένα και τρόποι αντιμετώπισης. ΓΕΩΡΓΙΑ-Κτηνοτροφία.
- Βακαλουνάκης Δ. Ι., 2010. «Ασθένειες της τομάτας. διάγνωση και αντιμετώπιση».
- Ζίφα Αιμ., Μαμούρης Ζ., Μούτου Κ. Βιολογία, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Θεσσαλίας, 2008, Βόλος.
- Μαργαρίτης Λ.Χ, Βιολογία κυττάρου, Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, 2004, Αθήνα
- Madigan M., Martinko M., Parker, Βιολογία των μικροοργανισμών, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 2005, Ηράκλειο.
- Τσαπικούνης Φ., 1996. Βιολογική και ολοκληρωμένη καταπολέμιση στο θερμοκήπιο, Εκδόσεις Σταμούλης, Α. Αθήνα.

